

**EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE
ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) DE LOS COLORANTES NATURALES DEL
FRUTO DEL AJÍ (*Capsicum spp*): CAPSANTINA Y CAPSORUBINA**

MARA ISABEL OROZCO SOLANO

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2006

**EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE
ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) DE LOS COLORANTES NATURALES DEL
FRUTO DEL AJÍ (*Capsicum spp*): CAPSANTINA Y CAPSORUBINA**

MARA ISABEL OROZCO SOLANO

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar
al título de Química

Director

JAIME MARTÍN. Ph.D

Asesor

QCA. CARMEN EUGENIA SOLARTE O.

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN

2006

Nota de aceptación:

Director

JAIME MARTÍN F. Ph.D

Jurado

TANIA MILENA GUTIERREZ M. Sc

Jurado

JUAN CARLOS ARGOTI M. Sc

Fecha de Sustentación: Popayán, Julio 12 de 2006

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser mi guía incondicional para lograr con éxito culminar una etapa más en mi vida.

Al profesor JAIME MARTIN FRANCO, por su apoyo, su amistad y grandes enseñanzas.

A CARMEN SOLARTE, por su gran amistad, su cariño y el gran apoyo que me brindo en todo momento, este triunfo también es tuyo.

Al profesor LUIS ALBERTO LENIS y a la profesora OLGA LUCIA HOYOS, por sus consejos, tolerancia y enseñanzas.

Al profesor RICARDO BENITEZ, por su colaboración, su amistad, sus consejos y enseñanzas.

A mis jurados, el profesor JUAN CARLOS ARGOTI y la profesora TANIA MILENA GUTIERREZ, por su inmensa colaboración, gracias a ustedes, esto fue posible.

A cada uno de los profesores del Departamento de Química por sus valiosas enseñanzas, por ser nuestros guías en el transcurso de la carrera.

A mis padres MARÍA A. y JAIME, por su paciencia, colaboración y el amor que me brindaron para seguir adelante y no decaer en los momentos difíciles, este triunfo es también de ustedes.

A mis hermanos Fabian y Jaime Andrés, por su gran apoyo, su cariño y consejos en los momentos gratos y tristes.

A Yeffersson, por su amistad, su comprensión y estar siempre ahí para escucharme cuando necesite de alguien.

A mis mejores amigas Diana, Cristina, Sandra, Luisa y Zully, a mi amigo Alex, por su gran apoyo, por la confianza que me brindaron, por el aliento en los momentos de angustia y por su inmensa comprensión.

A mis mejores amigas de colegio Nube, Monik y Diana, a mis amigos Javi y Cesar siempre encontré una mano amiga incondicional en ellos, gracias por su amistad y comprensión.

A una gran persona, Deya, por todo su apoyo, consejos y amistad, nunca cambies.

A mis compañeros del grupo de investigación Química de Productos Naturales, Jhon, William, Yessenia, Jordan, por su amistad, colaboración y paciencia en los días de trabajo.

A todas las personas que hacen parte de mi vida y que permitieron que lograré con éxito una etapa mas en mi vida. Gracias.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	16
INTRODUCCIÓN	18
1. MARCO TEORICO Y ANTECEDENTES	20
1.1 ORIGEN, MORFOLOGÍA DEL CULTIVO Y CLASIFICACIÓN	20
1.2 COMPOSICIÓN	21
1.2.1 Capsantina y Capsorubina	22
1.3 UTILIZACIÓN DE CAPSANTINA Y CAPSORUBINA	24
1.4 ANÁLISIS DE CAROTENOIDES	26
1.4.1 Procedimiento General para el análisis de carotenoides.	26
1.5 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA	29
1.5.1 Clasificación de los métodos cromatográficos	29
1.5.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	30
1.5.3 Detección y fases estacionarias	32
1.5.4 Análisis cuantitativo por HPLC	34
2. METODOLOGÍA	35
2.1 EQUIPOS Y REACTIVOS	35
2.1.1 Equipos	35
2.1.2 Reactivos	35
2.1.3 Solventes	36
2.2 RECEPCIÓN DE MUESTRA	37
2.3 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL PIGMENTO DEL FRUTO DEL AJÍ	38
2.3.1 Preparación del material de ensayo.	38
2.3.2 Determinación de propiedades físicas y análisis proximal	38
2.3.3 Proceso de secado	39
2.3.4 Obtención del pigmento del fruto del ají	40
2.4 EVALUACIÓN DEL PIGMENTO DEL FRUTO DEL AJÍ	40
2.4.1 Efecto de la luz ultravioleta en la estabilidad del pigmento.	41
2.4.2 Efecto de la temperatura en la estabilidad del pigmento.	41
2.4.3 Efecto de la acidez en la estabilidad del pigmento	41
2.5 SEPARACIÓN DE CAROTENOIDES MAYORITARIOS POR HPLC	41
2.5.1 Aislamiento de capsantina y capsorubina a partir del pigmento extraído	41

	Pág.
2.6 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE CUANTIFICACIÓN DE CAPSANTINA Y CAPSORUBINA POR HPLC	42
2.6.1 Condiciones experimentales	42
2.6.2 Elección de la fase móvil	42
2.6.3 Método de cuantificación	43
2.7 ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	44
2.7.1 Linealidad	44
2.7.2 Precisión	44
2.7.3 Sensibilidad	45
2.7.4 Exactitud	45
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
3.1 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL PIGMENTO DEL FRUTO DEL AJÍ	46
3.1.1 Determinación de propiedades físicas y análisis proximal	46
3.1.2 Proceso de secado	48
3.1.3 Obtención del pigmento del fruto del ají	50
3.2 EVALUACIÓN DEL PIGMENTO DEL FRUTO DEL AJÍ	59
3.3 SEPARACIÓN POR HPLC DE CAROTENOIDES MAYORITARIOS	61
3.3.1 Aislamiento de capsantina y capsorubina a partir del pigmento extraído	61
3.4 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE CUANTIFICACIÓN DE CAPSANTINA Y CAPSORUBINA POR HPLC	63
3.5 ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	67
3.5.2 Precisión	69
3.5.3 Sensibilidad	71
3.5.5 Estimación de la concentración por HPLC de capsantina y capsorubina en muestra de ají	76
4. CONCLUSIONES	79
5. BIBLIOGRAFIA	81
6. ANEXOS	88

LISTA DE ECUACIONES

	Pág.
ECUACIÓN 1	96
ECUACIÓN 2	97
ECUACIÓN 3	97
ECUACIÓN 4	97
ECUACIÓN 5	98
ECUACIÓN 6	98
ECUACIÓN 7	99
ECUACIÓN 8	99
ECUACIÓN 9	99
ECUACIÓN 10	100
ECUACIÓN 11	100

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Problemas comunes en muestreo y preparación de la muestra	27
Tabla 2. Clasificación de los métodos cromatográficos en columna.....	30
Tabla 3. Partes esenciales de un cromatógrafo líquido de alta eficiencia.....	32
Tabla 4. Principales ventajas del uso de una fase estacionaria en reversa en la separación cromatográfica	33
Tabla 5. Métodos para análisis proximal del fruto de ají, según la AOAC.....	38
Tabla 6. Propiedades físicas del fruto de ají variedad tabasco y habanero	46
Tabla 7. Análisis proximal de frutos de ají (100 g de muestra húmeda).....	47
Tabla 8. Tiempo empleado en los diferentes tratamientos de secado y contenido de humedad y color extraíble de las muestras deshidratadas.....	48
Tabla 9. Tiempo (horas:minutos) empleado en la extracción soxhlet y percolación.....	51
Tabla 10. Porcentajes (% p/p) de pigmento extraído por metodología soxhlet y percolación.....	51
Tabla 11. Evaluación de la estabilidad del pigmento extraído.....	59
Tabla 12. Condiciones empleadas en el análisis por Cromatografía de Alta Resolución (HPLC)	64
Tabla 13. Concentraciones y áreas de capsantina para la curva de calibración	68
Tabla 14. Concentraciones y áreas de capsorubina para la curva de calibración	68
Tabla 15. Test estadístico como indicador de una correlación lineal significativa.....	69
Tabla 16. Concentraciones del estándar de capsantina y sus respectivas desviaciones estándar en un rango de 0.1 a 0.9 ppm.....	70

Tabla 17. Concentraciones del estándar de capsorubina y sus respectivas desviaciones estándar en un rango de 0.1 a 1.0 ppm	70
Tabla 18. Reproducibilidad de las concentraciones de tres estándares de capsantina en un periodo de 15 días.	71
Tabla 19. Reproducibilidad de las concentraciones de tres estándares de capsorubina en un periodo de 15 días.	71
Tabla 20. Concentraciones del estándar de capsantina y sus respectivas áreas en un rango de 0.025 a 0.1 ppm para calcular LD y LC	72
Tabla 21. Concentraciones del estándar de capsantina y sus respectivas áreas en un rango de 0.010 a 0.1 ppm para calcular LD y LC	73
Tabla 22. Límite de detección (LD) para capsantina y capsorubina	73
Tabla 23. Límite de cuantificación (LC) para capsantina y capsorubina ⁴⁹	74
Tabla 24. Datos para realizar el t student y calcular el porcentaje de recuperación de estándares de capsantina en un rango de concentraciones de 0.1 a 0.9 ppm	75
Tabla 25. Datos para realizar el t student y calcular el porcentaje de recuperación de estándares de capsorubina en un rango de concentraciones de 0.1 a 1.0 ppm	75
Tabla 26. Cantidad de capsantina y capsorubina en muestras de ají (base seca)	77
Tabla 27. Porcentajes de recuperación de una solución de capsantina de 0.5 ppm en muestras de ají	78
Tabla 28. Porcentajes de recuperación de una solución de capsorubina de 0.5 ppm en muestras de ají	78
Tabla 29. Evaluación de eluentes para la estandarización de la fase móvil para el análisis por HPLC	94
Tabla 30. Altura de plato teórico y flujo para la curva de van Deemter	95
Tabla 31. Comparación de las medias muestrales de las metodologías soxhlet y percolación para capsantina en la variedad habanero	101

Tabla 32. Comparación de la medias muestrales de las metodologías soxhlet y percolación para capsorubina en la variedad habanero	101
Tabla 33. Comparación de la medias muestrales de las metodologías soxhlet y percolación para capsantina en la variedad tabasco	102
Tabla 34. Comparación de la medias muestrales de las metodologías soxhlet y percolación para capsorubina en la variedad tabasco	102

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Frutos de ají de diferentes variedades en su estado a) verde b) maduro	20
Figura 2. Estructura química de la capsantina 1 y capsorubina 2	22
Figura 3. Propiedades fisicoquímicas de capsantina y capsorubina	23
Figura 4. Posible esquema de la degradación de carotenoides	24
Figura 5. Esquema de una posible configuración de un cromatógrafo líquido	31
Figura 6. Cromatograma típico de una elución por HPLC	32
Figura 7. Variedades empleadas en la determinación de capsantina y capsorubina	37
Figura 8. Muestra de ají de la variedad Habanero y Tabasco seca a: a) y d) Temperatura ambiente, b) y e) 50 °C, c) y f) 100 °C	39
Figura 9. Efecto de los diferentes tratamientos de secado, solvente extractor y contenido de semilla sobre la cantidad de capsantina y capsorubina para la variedad Habanero a) Metodología soxhlet, b) Metodología de percolación; con semilla y sin semilla	54
Figura 10. Efecto de los diferentes tratamientos de secado, solvente extractor y contenido de semilla sobre la cantidad de capsantina y capsorubina para la variedad Habanero a) Metodología soxhlet, b) Metodología de percolación; con semilla y sin semilla	55
Figura 11. Comparación de cromatogramas de las extracciones con acetona, etanol y hexano en muestras de ají sin semilla por extracción soxhlet para la variedad habanero. Condiciones experimentales: Tabla 12	57
Figura 12. Comparación de cromatogramas de las extracciones en muestras con semilla y sin semilla, por extracción soxhlet para la variedad habanero. Condiciones experimentales: Tabla 12	57

- Figura 13.** Comparación de cromatogramas de las extracciones soxhlet en muestras sin semilla a diferentes temperaturas de secado; temperatura ambiente, 50 °C, y 100 °C para la variedad habanero. Condiciones experimentales: Tabla 12 58
- Figura 14.** Comparación de cromatogramas de las extracciones con acetona por metodología soxhlet en muestras deshidratadas a temperatura ambiente sin semilla para la variedad tabasco y la variedad habanero. Condiciones experimentales: Tabla 12 58
- Figura 15.** Espectro de absorción de un extracto acetónico (80 acetona: 20 agua) de las muestras de puré de pimientos rojos. 60
- Figura 16.** Espectro UV-Vis **a)** de la fracción limpia obtenida a partir del extracto de ají, patrones estándar de 2.5 ppm de **b)** capsantina, y **c)** capsorubina 62
- Figura 17.** Cromatograma tridimensional de los patrones de capsantina y capsorubina inyectados cuatro veces bajo las condiciones resumidas en el tabla 12. 65
- Figura 18.** Cromatograma de las soluciones estándar de capsantina empleadas en la curva de calibración. Condiciones experimentales: Tabla 12. Concentraciones y áreas: Tabla 14 66
- Figura 19.** Cromatograma de las soluciones estándar de capsorubina empleadas en la curva de calibración. Condiciones experimentales: Tabla 12. Concentraciones y áreas: Tabla 15 66
- Figura 20.** Curva de calibración para la determinación de capsantina en frutos de ají. Condiciones experimentales: Tabla 12. Concentraciones y áreas: Tabla 13 68
- Figura 21.** Curva de calibración para la determinación de capsorubina en frutos de ají. Condiciones experimentales: Tabla 12. Concentraciones y áreas: Tabla 14 68
- Figura 22.** Curva de calibración para determinar LD y LC de capsantina en frutos de ají. Condiciones experimentales: Tabla 12. Concentraciones y áreas: Tabla 20. 72
- Figura 23.** Curva de calibración para determinar LD y LC de capsorubina en frutos de ají. Condiciones experimentales: Tabla 12. Concentraciones y áreas Tabla 21. 73

- Figura 24.** Cromatograma de tres inyecciones consecutivas de muestras de ají bajo las condiciones de la tabla 4: a) variedad habanero y b) variedad tabasco 76
- Figura 25.** Cromatogramas de capsantina y capsorubina en (a) Extracto no saponificado (b) Extracto saponificado y ampliado (c) Comparación de la muestra (pigmento extraído) y el patrón 77

LISTA DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

ACN:	Acetonitrilo
AE:	Acetato de etilo
AOAC:	Métodos oficiales de análisis
CCD:	Cromatografía de capa delgada
FF1:	Fruto fresco con semilla
FF2:	Fruto fresco con semilla
FS1:	Fruto seco con semilla
FS2:	Fruto seco sin semilla
g:	Gramos
h:	Hora
Ha:	Hectárea
HPLC:	Cromatografía líquida de alta resolución
HR	Humedad relativa
M:	Molaridad
MeOH	Metanol
mg:	Miligramos
min:	Minutos
mL:	Mililitros
nm:	Nanómetros
°C:	Grado centígrado
ppm:	Partes por millón
THF	Tetrahidrofurano
t _r	Tiempo de retención
UV-Vis:	Ultravioleta visible
U.v	Ultravioleta
v/v	Volumen/volumen

RESUMEN

La propiedad colorante del ají se atribuye a los carotenoides presentes en el fruto. De ahí que sus aplicaciones estén basadas en esta propiedad, además de la pungencia que la especia posee; en la actualidad, es empleado ampliamente en la industria de alimentos procesados para colorear un elevado número de productos tales como cárnicos, cereales, gelatina y otros alimentos procesados, igualmente presentan propiedades benéficas para el organismo. El cultivo del ají puede convertirse en una alternativa aprovechable debido a que sus componentes, carotenoides, capsaicinoides, vitaminas, entre otros, pueden generar una gama de productos que aumentan su valor agregado y por tanto dan rentabilidad al agricultor.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), es una técnica ampliamente empleada para la determinación cuantitativa de carotenoides del fruto del ají debido a su rapidez, simplicidad, alta sensibilidad, precisión y capacidad para determinar simultáneamente varios carotenoides. En esta investigación se realizó la estandarización del método cromatográfico para la cuantificación de los pigmentos mayoritarios del ají: Capsantina y capsorubina; aplicados al análisis de oleorresinas obtenidas de dos variedades cultivadas en el departamento del Cauca: Habanero y Tabasco.

Para tal efecto, se emplearon tres solventes extractores de diferente polaridad: Etanol, acetona y hexano, además de analizaron las metodologías soxhlet y percolación a partir del frutos con y sin semilla, los cuales fueron sometidos a diferentes temperaturas tales como: ambiente, 50 °C y 100 °C.

Se comparó la composición de los pigmentos de cada uno de los tratamientos, evaluando preliminarmente el solvente de mayor extracción, la metodología más eficiente de extracción y la optima temperatura de secado. Las muestras de las

variedades Tabasco y Habanero con secado a temperatura ambiente y extraídas por metodología soxhlet con acetona presentaron las mayores proporciones de capsantina y capsorubina. Para el tratamiento de las muestras de ají se siguieron las metodologías reportadas por la AOAC y artículos reportados por Kim y Weissenberg, obteniéndose porcentajes de recuperación promedio de 92.21 y 91.83% para capsantina y capsorubina respectivamente.

Adicionalmente, es importante señalar que el desarrollo de esta investigación contribuye a la dilucidación de una metodología óptima y reproducible para la determinación y cuantificación de los pigmentos mayoritarios del ají, especie de la cual no se han elaborado estudios relacionados con el aprovechamiento de sus pigmentos en el departamento del Cauca.

INTRODUCCIÓN

El color es la primera sensación que se percibe de un alimento y la que determina el primer juicio sobre su calidad. Igualmente, es un factor importante dentro del conjunto de efectos que aporta el alimento y en ocasiones tiende a modificar subjetivamente el sabor como el olor.

Los alimentos naturales, tienen su propio color, por lo que en principio sería ideal su mantenimiento a lo largo del proceso de transformación. Sin embargo, los consumidores prefieren en determinados alimentos un color constante, que no varíe entre los diferentes lotes de fabricación de un producto.

La variabilidad natural de las materias primas hace que un color normalizado sólo pueda obtenerse modificándolo de forma artificial. Por otra parte, muchas sustancias colorantes naturales de los alimentos, son muy sensibles a los tratamientos utilizados en el procesado (Calor, acidez, luz, conservantes, etc.), destruyéndose, por lo que se hace necesario minimizar el daño causado por ellos, optimizando las condiciones manejadas en el proceso de comercialización.

Actualmente las regulaciones legales han hecho desaparecer muchos de los colorantes utilizados por ser nocivos para la salud. Además, cuando es posible hay tendencia a utilizar colorantes naturales en lugar de colorantes sintéticos, motivada por la presión de un sector importante de los consumidores¹.

Los colorantes naturales son considerados en general como inocuos y consecuentemente las limitaciones específicas en su utilización son menores que las que afectan a los colorantes artificiales². La creciente concientización sobre la salud y el estilo de vida son los principales factores que influyen en el desarrollo de nuevos

productos alimenticios más naturales, es por esto que investigadores toman desafíos y se proyectan al desarrollo de métodos para la extracción y análisis de nuevos productos

El pigmento natural obtenido del extracto del fruto del ají, posee gran cantidad de carotenoides, de los cuales los mayoritarios son capsantina y capsorubina, que aportan cerca del 60 % de los carotenoides totales y son los responsables del color rojo. El color extraído del fruto del ají es usado extensivamente en la industria de alimentos procesados para colorear un amplio rango de productos tales como productos cárnicos, cereales, frutas y hortalizas elaboradas, quesos madurados, concentrados para animales, gelatina, entre otros.³. De esta manera el ají se convierte en un potencial para la investigación y formulación de productos modificadores organolépticos con características de procesamiento y estabilidad que satisfacen las exigencias del cliente para ser usados en la industria⁴.

A lo largo del tiempo y desde que Zechmeister y colaboradores consiguieran aislar algunos de los carotenoides presentes en frutos y plantas⁵, han sido numerosos los trabajos llevados a cabo para cuantificar los carotenoides del fruto del ají. Para su aislamiento se utilizan técnicas de cromatografía en capa delgada y cromatografía en columna abierta, además, sistemas como cromatografía líquida de alta resolución y extracción por fluidos supercríticos son usados para este fin^{22,6,7}.

En este estudio se desarrolló un método para la identificación y cuantificación de carotenoides capsantina y capsorubina del fruto del ají, empleando un sistema de cromatografía líquida de alta resolución, donde se optimizaron las variables cromatográficas: tiempo de retención, proporción de fase móvil, resolución, entre otros. Se evaluaron parámetros para el desarrollo del proceso óptimo de extracción, con resultados significativos que podrían ser usados en el escalamiento del proceso, para generar valor agregado a esta especia abriendo la posibilidad de emplear sus productos en diferentes campos industriales generando así mayor rentabilidad al cultivo del ají.

1. MARCO TEORICO Y ANTECEDENTES

1.1 ORIGEN, MORFOLOGÍA DEL CULTIVO Y CLASIFICACIÓN

El ají o chile picante es una planta nativa de América Latina, ésta hortaliza herbácea pertenece a la familia de las *Solanáceas* y el género *Capsicum*, incluye aproximadamente 30 especies, de las cuales las mas cultivadas son *Capsicum annuum* de ajíes moderadamente picantes y *Capsicum frutescens* de ajíes mas picantes⁴.

Esta planta alcanza un tamaño entre 80 – 120 cm, desarrollando un solo tallo hasta la primera flor y raíces discretamente profundas. Sus hojas lanceoladas y oblongas son de color verde intenso y sus flores solitarias presentan color blanco. Sus frutos son bayas con cavidades en donde alberga las semillas que presentan forma de riñón y textura lisa. En un gramo de fruto se pueden encontrar alrededor de 130 semillas. Los frutos son verdes al inicio y cuando maduran alcanzan tonalidades que están entre el amarillo y el rojo⁸ (figura 1).

Figura 1. Frutos de ají de diferentes variedades en su estado a) verde b) maduro



a)



b)

Entre las variedades mas representativas se encuentran: Tabasco, Jalapeño, Hungarian, Yellow Wax, Chile, Floral Gem, Red Chili y Roumanian Hot⁹. Algunas de estas variedades actualmente en las regiones tropicales y subtropicales de Colombia han aumentado su popularidad por su elevado poder nutritivo y rentabilidad para el productor.

1.2 COMPOSICIÓN

Los frutos de ají presentan una composición variable dependiendo del cultivo y del estado de maduración en el que son cosechados. Tienen un alto contenido de ácido ascórbico, valor que incluso es superior al de los cítricos, presentan un valor casi 10 veces más alto de contenido de pro-vitamina A que los pimientos y, además se caracterizan por su elevada pungencia que depende de un grupo de compuestos llamados capsaicinoides que se encuentran en glándulas o receptáculos de la placenta y septas y de los cuales la capsaicina es el principal miembro de este grupo⁹.

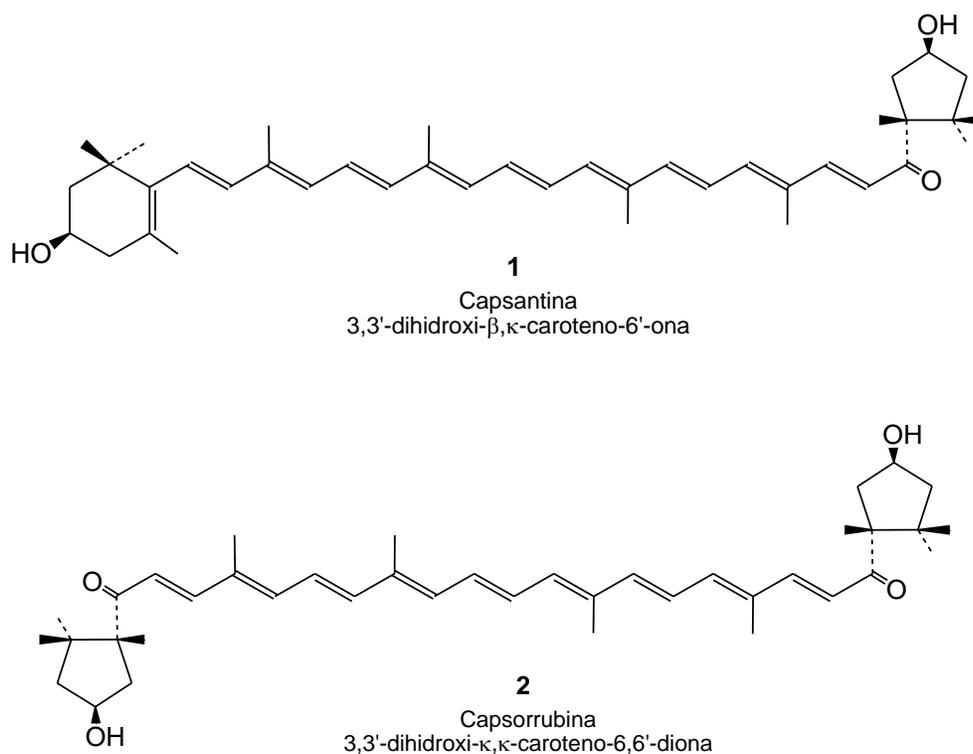
La intensidad y matiz de los colores característicos del ají dependen del tipo de carotenoides que están presentes y su concentración. Estos pigmentos se encuentran invariablemente en los cloroplastos de las plantas superiores, aunque en este tejido fotosintético su color está enmascarado por la clorofila¹⁰. Igualmente se acumulan en cantidades considerables en el pericarpio proporcionándole al fruto maduro un color intenso, lo que lo hace útil para la producción de colorantes alimenticios¹¹.

Entre los mayores pigmentos carotenoides y únicos en el género *Capsicum* se encuentran capsantina **1** y capsorubina **2**, (Figura 2) los cuales proveen el color rojo a los frutos de ají¹². En el fruto del ají existen más carotenoides que contribuyen en menor proporción a la coloración de este, pero su abundancia es relativamente baja⁹.

1.2.1 Capsantina y Capsorubina

Estos dos carotenoides pertenecen al grupo de los derivados oxigenados denominados xantofilas y al subgrupo de oxocarotenoides que se caracterizan por los grupos cetónicos que contienen¹³. La figura 2 muestra las estructuras de capsantina y capsorubina, constituidas por unidades básicas de 5 carbonos, isoprenoides, que dan origen al tetraterpeno característico de estas estructuras.

Figura 2. Estructura química de la capsantina **1** y capsorubina **2**

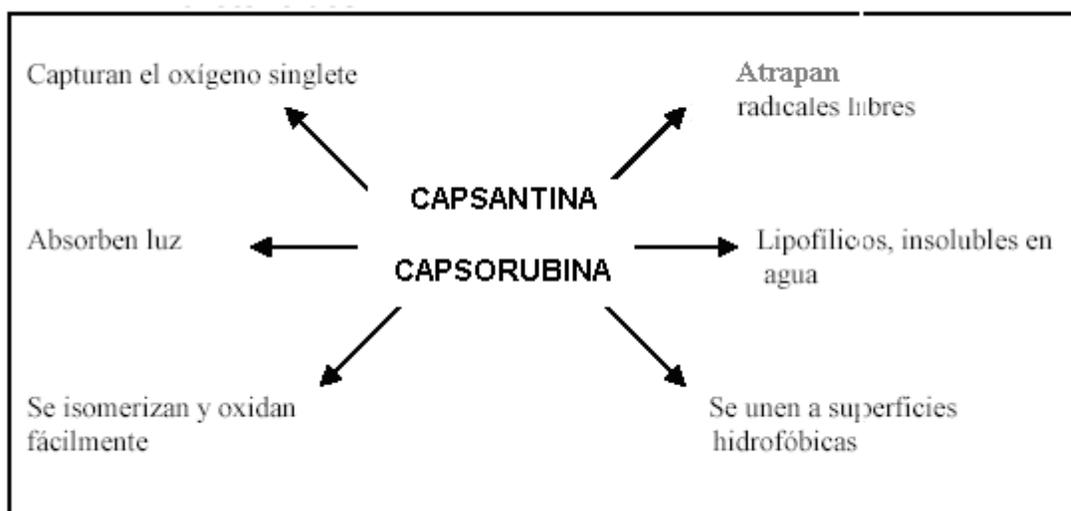


Su extenso sistema de dobles enlaces conjugados, denominado cadena poliénica, es la responsable de la capacidad de absorción de luz en la región visible y en consecuencia de la coloración de estos pigmentos. La intensidad del color es determinada espectrofotométrica mediante la metodología ASTA 20.1⁹ (American

Spice Trade Association). Los ajíes rojos llegan a alcanzar hasta 300 unidades ASTA.

Algunas de las propiedades fisicoquímicas de los carotenoides mayoritarios del fruto del ají, capsantina y capsorubina, se exhiben en la figura 3, el esqueleto básico puede modificarse por hidrogenación, deshidrogenación, ciclación, migración del doble enlace, acortamiento o extensión de la cadena, reordenamiento, isomerización, introducción de funciones oxigenadas o por combinaciones de estos procesos, dando como resultado una gran diversidad de estructuras¹⁰. Por la actividad química, la extracción y cuantificación de los carotenoides presenta dificultades que generalmente no son percibidas, por lo que es aconsejable realizar un muestreo adecuado y preparar la muestra para evitar este tipo de cambios químicos durante el análisis.

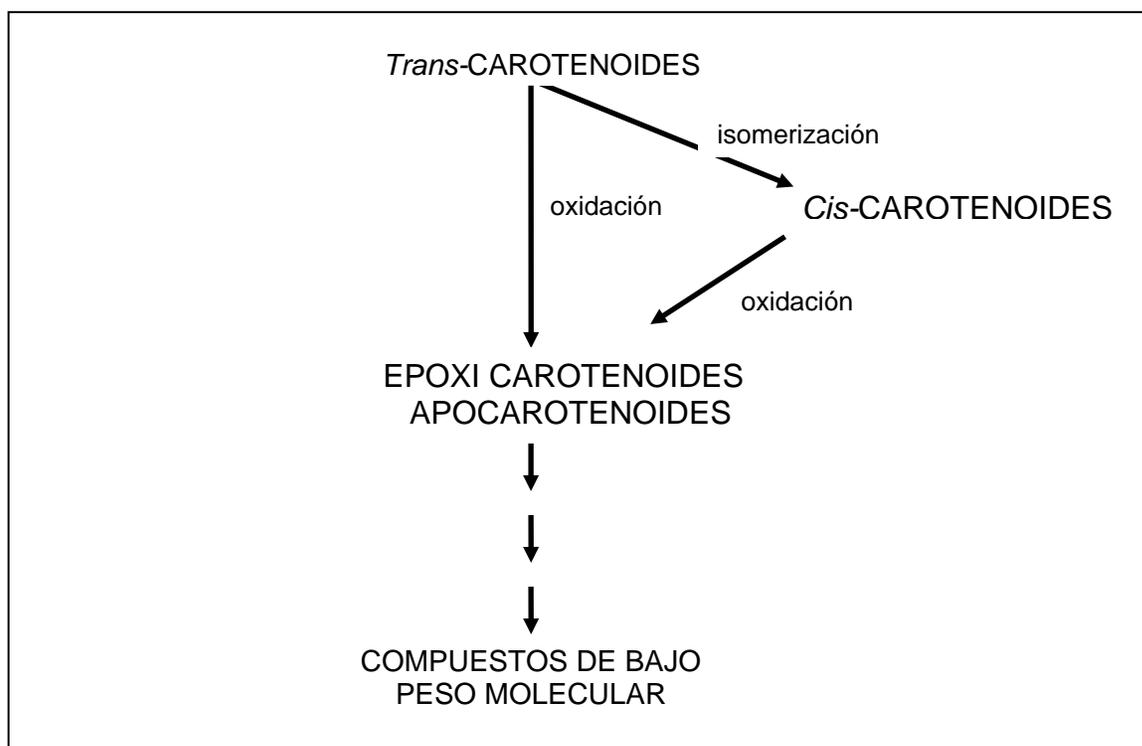
Figura 3. Propiedades fisicoquímicas de capsantina y capsorubina



La cadena poliénica de capsantina y capsorubina, es irónicamente la causa de su inestabilidad, incluyendo su susceptibilidad a la oxidación (combinación con oxígeno) e isomerización geométrica (cambio de la geometría del enlace doble). El calor, la luz, los ácidos y las bases promueven la isomerización de los carotenoides *trans*, su configuración habitual en la naturaleza a la forma *cis*. La oxidación, la causa

principal de las pérdidas de carotenoides, depende del oxígeno disponible, los carotenoides involucrados y su condición física. La luz, el calor, los metales, las enzimas y peróxidos estimulan la oxidación que es inhibida por los antioxidantes tales como: Tocoferoles (vitamina E) y ácido ascórbico (vitamina C)¹⁴.. La figura 4 muestra un posible esquema de los productos de degradación de los carotenoides.

Figura 4. Posible esquema de la degradación de carotenoides



1.3 UTILIZACIÓN DE CAPSANTINA Y CAPSORUBINA

La capsantina y capsorubina, extraídos del fruto del ají han sido extensamente utilizados en la industria de alimentos procesados¹⁵ e incluso en concentrados para gallinas empleados para intensificar el color de las yemas de los huevos¹⁶.

Los carotenoides mayoritarios del ají son de los más importantes colorantes alimentarios que han sido aprobados por la legislación de Luxemburgo¹⁷, el aspecto que favorece su empleo se debe a que proviene de una fuente natural. Generalmente su función como aditivo, mejora el nivel nutritivo, conserva la frescura,

impide el deterioro por microorganismos e insectos, además genera propiedades sensoriales deseables¹⁸. Son considerados inocuos y consecuentemente las limitaciones específicas en su utilización son menores que las restricciones de los colorantes artificiales.

Otro aspecto importante de las propiedades de estos carotenoides, está relacionado con mejorar el sistema inmunológico y una disminución del riesgo de enfermedades degenerativas tales como cáncer, enfermedades cardiovasculares, degeneración muscular relacionada a la edad y formación de catarata^{19,20,21}. Estos efectos biológicos se han atribuido a la propiedad antioxidante de capsantina y capsorubina a través de la desactivación de los radicales libres (Átomos o grupos de átomos que poseen al menos un electrón no compartido) como ocurre en el oxígeno singlete.

La capacidad de estos pigmentos para capturar el oxígeno singlete se relaciona con el sistema π de nueve dobles enlaces conjugados que le otorgan la máxima protección¹¹. Este tipo de oxígeno es un radical libre que reacciona con las biomoléculas celulares tales como: Lípidos, proteínas y ADN e inicia eventos que producen un incremento del riesgo de enfermedades crónicas tales como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y osteoporosis²². Según estudios,^{12,24} la capsantina y capsorubina, ambas con grupos cetónicos conjugados son mejores antioxidantes que el β -caroteno y la zeaxantina.

En la industria textil, los colorantes son materia prima que deben cumplir ciertos requerimientos exigidos en el ámbito internacional, como: No presentar toxicidad, ni cancerígenos, ni producir alergias, presentar solidez frente al sudor, a la luz, al frote, al lavado y a los gases contaminantes; además mantener la estabilidad del color en el tiempo. Actualmente se llevan a cabo diversos estudios en los cuales se realizan modificaciones físicas para mejorar la estabilidad de colorantes naturales para que sean empleados en la industria textil como es el teñido de fibras²³. En este campo el grupo de investigación Química de Productos Naturales del Departamento de Química de la Universidad del Cauca, actualmente está desarrollando el estudio para

la utilización del pigmento del ají en el teñido de fibras, especialmente algodón y los resultados aquí obtenidos serán de importancia en la industria textil y agrícola.

Su extensa aplicabilidad en la industria ha contribuido al desarrollo de metodologías para la extracción y cuantificación de estos carotenoides del fruto de ají; así por ejemplo Mínguez y Hornero²⁴ utilizaron para ello técnicas HPLC, por su parte Jare'n, Uwe y Schwartz han desarrollado metodologías separativas por fluidos supercríticos.

1.4 ANÁLISIS DE CAROTENOIDES

1.4.1 Procedimiento General para el análisis de carotenoides.

En la actualidad, el procedimiento de análisis e identificación de los carotenoides en muestras biológicas se realiza en tres etapas principales²⁵. En la primera, se obtiene el extracto crudo, posteriormente, el extracto es sometido a extracción en un cartucho empleando como fase sólida sílica gel para eliminar interferencias polares, o de octadecilsilano, para eliminar impurezas apolares, ó ambos.

El extracto se recupera nuevamente por elución con un solvente adecuado y finalmente se somete a análisis y/o fraccionamiento preparativo por HPLC; técnica ventajosa debido a que se puede trabajar a bajas temperaturas, en ausencia de luz y aire y es muy sensible. Aunque se han utilizado columnas de fase normal, son más utilizadas las de fase reversa, especialmente las de octadecilsilano (columnas C-18). La identificación puede hacerse por comparación con los tiempos de retención de carotenoides estándares, o en el caso preparativo los carotenoides aislados se someten a análisis espectrales de masas, RMN, etc.

El desarrollo reciente de interfaces HPLC Espectrometría de masas, y detectores como los de arreglo de diodos, permiten obtener los correspondientes espectros de masas y UV-Vis, los cuales facilitan el proceso de identificación. Otros métodos analíticos recientes desarrollados son el de aislamiento por cromatografía en contracorriente²⁶ y y determinación de carotenoides en preparados galénicos²⁷.

Muestreo y preparación de la muestra. Para desarrollar el análisis es necesario partir de una muestra representativa del lote bajo investigación. La preparación de la muestra incluye operaciones físicas de eliminación de impurezas, cortado, secado, molienda y tamizado. Posteriormente se obtiene una muestra analítica por el método de cuarteo, la cual es almacenada en condiciones adecuadas. Los problemas encontrados para el análisis en el muestreo y preparación de la muestra, son descritos en la tabla 1.

La preparación de la muestra debe ser adaptada a la naturaleza del alimento, al tipo de analito y a la técnica analítica, como bien de la distribución del analito en el alimento²⁸.

Tabla 1. Problemas comunes en muestreo y preparación de la muestra

Muestreo	Dificultad en obtener muestras pequeñas representativas de muestras grandes.
	Pérdidas del material de la planta
Preparación de la muestra	Dificultad de remover material extraño de planta sin remover algún constituyente de ésta, incluyendo el analito
	Cambios enzimáticos antes y durante el análisis
	Cambios en la composición durante la maduración

Extracción. Un buen procedimiento de extracción es el que libera todos los carotenoides de la matriz del alimento y los tiene en solución sin alterarlos. El proceso de extracción debe ser adaptado para cada alimento que va a ser analizado. Los solventes seleccionados deben extraer eficientemente todos los carotenoides presentes en la muestra, tener puntos de ebullición bajos para evitar calentamiento prolongado, ser solventes orgánicos miscibles con el agua (por ejemplo, acetona, metanol, etanol o mezclas de estos) si el alimento a analizar se encuentra fresco, por el alto contenido de agua; si está seco se emplean solventes orgánicos apolares.

Partición. El extracto usualmente contiene una cantidad sustancial de agua, el cual puede ser removido por partición con hexano o éter de petróleo, éter etílico o

mezclas de estos solventes, estas últimas son empleadas para extractos con grandes cantidades de xantofilas.

Saponificación. La saponificación permite remover clorofilas y lípidos no deseados, los cuales pueden interferir con la separación cromatográfica. El proceso de saponificación simplifica la separación cromatográfica, identificación y cuantificación. Pues los carotenoides libres son analizados en menor tiempo que los esterificados, los cuales usualmente presentan dificultad en la separación de esterres con una variedad de ácidos grasos. Si en el extracto existen carotenoides esterificados, estos se pueden hidrolizar disolviendo el extracto en un volumen pequeño de hidróxido alcohólico.

Separación Cromatográfica. La separación cromatográfica de los carotenoides se puede realizar mediante la clásica cromatografía de columna abierta (CCA) o por HPLC. Aunque útil para identificar los carotenoides, no se recomienda la cromatografía de capa fina (TLC) para el análisis cuantitativo, debido a las dificultades en recuperar los carotenoides separados de las placas y la posibilidad de isomerización y oxidación en la superficie altamente expuesta. Tampoco es apropiada la cromatografía de gases (CG) debido a la termolabilidad y baja volatibilidad de los carotenoides²⁹.

Se ha señalado muy a menudo que la determinación de carotenoides se debería realizar mediante HPLC, siendo considerada inadecuada la CCA. Sin embargo, las investigaciones^{30, 31, 32} han demostrado que cualquiera de estos métodos cromatográficos se puede usar en forma confiable, siempre que el análisis se realice bajo condiciones óptimas. La exactitud y reproducibilidad de los resultados utilizando CCA depende de la habilidad del analista en empacar la columna y en ajustar los volúmenes y proporciones de los solventes utilizados para la elución (remoción desde el adsorbente), así como también la agudeza para visualizar la separación.

Identificación y cuantificación. Debido a que los carotenoides absorben en forma máxima a diferentes longitudes de onda y tienen diferentes coeficientes de absorción, los

resultados obtenidos de la normalización (porcentajes de área) sólo se pueden considerar como proporciones relativas aproximadas. Sin embargo, para la industria de alimentos y para propósitos nutricionales, los resultados son sólo útiles si se presentan en términos de concentración, es decir, peso de carotenoide por unidad de peso de la muestra comestible. Esto se puede realizar en HPLC mediante curvas de calibración interna o externa, para lo cual se deben determinar también espectrofotométricamente las concentraciones de los estándares.

1.5 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

Las aplicaciones de la cromatografía han aumentado en gran manera en los últimos años, debido, no sólo al desarrollo de nuevos y diversos tipos de técnicas cromatográficas, sino también a las necesidades crecientes, por parte de los científicos, de mejores métodos para la caracterización de mezclas complejas entre las cuales se encuentra la separación de pigmentos obtenidos a partir de diversos alimentos⁵.

1.5.1 Clasificación de los métodos cromatográficos

Los métodos cromatográficos se pueden clasificar de dos modos distintos. El primero de ellos se basa en la forma en que las fases estacionaria y móvil se ponen en contacto. En la *cromatografía en columna*, un tubo estrecho contiene la fase estacionaria a través de la cual se hace pasar la fase móvil por presión. En la *cromatografía en plano*, la fase estacionaria se fija sobre una placa plana o a los intersticios de un papel; en este caso la fase móvil se desplaza a través de la fase estacionaria por capilaridad o por gravedad.

Una clasificación fundamental de los métodos cromatográficos se basa en el tipo de fase móvil y estacionaria, y en la clase de equilibrios implicados en la transferencia de los solutos entre las fases. La tabla 2 da la relación de las tres clases generales de cromatografía: cromatografía de líquidos, cromatografía de gases y cromatografía de fluidos supercríticos⁵.

Tabla 2. Clasificación de los métodos cromatográficos en columna

Clasificación general	Método específico	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
Cromatografía de líquidos (LC) (fase móvil: líquida)	Líquido- líquido o reparto	Líquido adsorbido sobre un sólido	Distribución entre líquidos inmiscibles
	Líquido-fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el líquido y la superficie enlazada
	Líquido-sólido, o adsorción	Sólido	Adsorción
	Intercambio iónico	Resina de Intercambio iónico	Intercambio iónico
	Exclusión por tamaño	Líquido en los intersticios de un sólido polimérico	Distribución/ exclusión
Cromatografía de gases (GC) (fase móvil: gas)	Gas- líquido	Líquido adsorbido sobre un sólido	Distribución entre un gas y un líquido
	Gas- fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el líquido y la superficie sólida enlazada
	Gas- sólido	Sólido	Adsorción
Cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) (fase móvil: fluido supercrítico)		Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el fluido supercrítico y la superficie enlazada

1.5.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) es la técnica de separación mas ampliamente utilizada, las razones de la popularidad de esta técnica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general. Algunos ejemplos de

estos materiales incluyen: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, terpenoides (carotenoides), plaguicidas, antibióticos, entre otros⁵.

La cromatografía líquida es un método cromatográfico separativo. Así, el lugar donde se produce la separación, la columna, puede considerarse el corazón del sistema cromatográfico, alrededor del cual se monta un equipo de mayor o menor complejidad. En el caso más simple (Figura 5), el cromatógrafo líquido está constituido, por las partes que se indican en la tabla 3:

Figura 5. Esquema de una posible configuración de un cromatógrafo líquido

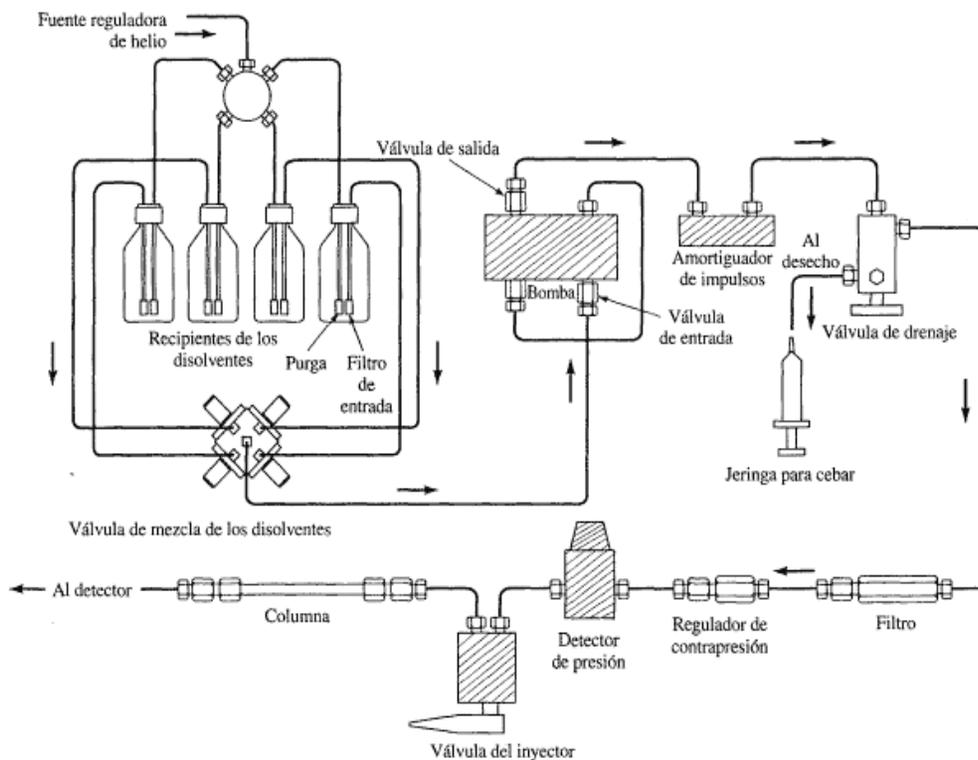
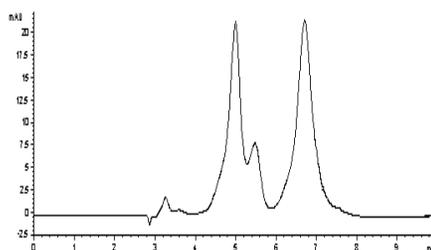


Tabla 3. Partes esenciales de un cromatógrafo líquido de alta eficiencia

Parte	Descripción
Reservorio de solvente	Alimenta al sistema con la fase móvil
Inyector	Sistema que permite la introducción de la muestra
Bomba	Sistema para forzar el pasaje de la muestra y la fase móvil a través de la columna
Detector	Sistema de monitoreo de la solución que emerge de la columna
Software	Sistema de registro de los datos provenientes del detector. La señal del detector es siempre analógica y puede ser utilizada tal cual por un registrador gráfico o por un integrador, o digitalizada, para que pueda ser interpretada y procesada por una computadora.

Como resultado del análisis cromatográfico se obtienen un cromatograma, el cual es un gráfico, que relaciona la concentración de soluto en función del tiempo de elución (Figura 6) y un eluido, fluido proveniente de la columna que, de recolectarse en forma secuencial o escalonada (Manualmente o con un colector de fracciones), contiene la fase móvil e idealmente, los componentes de la muestra separados.

Figura 6. Cromatograma típico de una elución por HPLC



1.5.3 Detección y fases estacionarias

Un sistema de dobles enlaces conjugados extenso conocido como cromóforo es el rasgo estructural distintivo de los carotenoides. Este grupo es el responsable de la capacidad de los carotenoides de absorber luz en la región visible y en consecuencia de su coloración. Por esta característica se emplean para su detección los detectores espectrofotométricos en HPLC,

por la alta sensibilidad y precisión, y porque son capaces de seleccionar una sola longitud de onda y en algunos casos son programables para que cambie la longitud de onda durante la separación cromatográfica²⁹.

La mayoría de separaciones de carotenoides reportada en la literatura involucra el uso de fase reversa en HPLC, en lugar de la fase normal, sin destacar que hay análisis cualitativos y cuantitativos de separación de carotenoides por HPLC en fase normal³³. Las ventajas de la cromatografía en fase reversa se resumen en la tabla 4:

Tabla 4. Principales ventajas del uso de una fase estacionaria en reversa en la separación cromatográfica

Características del uso de fase reversa	Compuestos no iónicos, iónicos e ionizables pueden ser separados en la misma columna, con la misma fase móvil.
	La fuerza de atracción superficie no polar-soluto es débil.
	La adsorción irreversible, frecuentemente en gel de sílice, raramente ocurre.
	La fase móvil predominante es agua, abundante y económica
	El modificador orgánico predominante, metanol, es asequible en calidad y precios adecuados.
	El orden de elución es predecible, en función de la hidrofobicidad del analito.
	Se necesita poco tiempo para el equilibrio del sistema luego de un cambio de fase móvil.

En la separación de capsantina y capsorubina por HPLC empleando fase reversa, los parámetros enunciados en la anterior tabla determinan que según las características de los dos analitos, compuestos no iónicos, con grupos polares en sus anillos terminales, pueden ser separados fácilmente en una fase estacionaria apolar empleando la fase móvil medianamente polar, proceso en el que se encontraran tiempos de retención y tiempos de equilibrio bajos

1.5.4 Análisis cuantitativo por HPLC

La cromatografía líquida de alta resolución, como cualquier otro método cromatográfico, es una herramienta sumamente útil para el análisis cuantitativo de mezclas de sustancias. El rápido crecimiento que este método analítico ha experimentado en las últimas décadas, si bien se debe a diversos factores, se basa fundamentalmente en la simplicidad con la cual se obtienen por HPLC resultados cuantitativos. Actualmente la separación por HPLC permite cuantificar tanto impurezas en muy bajas concentraciones como macro componentes con niveles de precisión tan bajos como 0.5 %, y aun menores. En el análisis cuantitativo influyen factores como el muestreo, preparación de la muestra, inyección de la muestra, separación cromatográfica, detección, integración de la señal y cálculo de la concentración del analito³⁴.

2. METODOLOGÍA

2.1 EQUIPOS Y REACTIVOS

La metodología de este trabajo se desarrolló empleando reactivos y solventes grado analítico para los procesos de extracción y caracterización de propiedades químicas y físicas del pigmento, además grado HPLC o grado cromatográfico para la determinación e identificación de los carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución. En la siguiente sección se listan los instrumentos y los reactivos empleados para las diferentes determinaciones.

2.1.1 Equipos

- Espectrofotómetro Ultravioleta- visible GENESIS 6
- Cromatógrafo de líquidos HEWLETT PACKARD 1100, desgasificador G 1322A, bomba cuaternaria G 1311A, detector UV-Vis G1314A, columna Hypersil ODS C₁₈ - 5µm x 4,0 x 250 mm
- Rota evaporador HEIDOLPH LABOROTA 4001
- Mini vap- Supelco con pipa de nitrógeno
- Espectrofotómetro infrarrojo IR 200 THERMO ELECTRONIC
- Planchas CORNING PC-420
- Balanza analítica PRECISA XT 220A (220 g/0.001 g)
- Horno FISCHER SCIENTIFIC-Modelo 851 F
- Equipo de digestión y destilación BÜCHI

2.1.2 Reactivos

- Hidróxido de potasio 85 %
- Óxido de magnesio 98 %
- Sulfato de sodio anhidro 99.8 %

- Capsantina (Carotenature GmbH)
- Capsorubina (Carotenature GmbH)
- Butil hidroxil anisol 99.0 %
- Silica Gel, 70-230 mesh Volumen de poro: 0.75 cm³/g
- Cloruro de sodio 98 %

2.1.3 Solventes

- Acetona 99.5 %
- Hexano 98.5 %
- Etanol absoluto 99.9 %
- Metanol 99.98 %
- Éter de petróleo 39-53 °C
- Éter etílico 99.9 %
- Isopropanol 99.9 %
- Acetonitrilo 99.99 %
- Acetato de etilo 99.8 %
- Tetrahidrofurano 99.5 %

2.2 RECEPCIÓN DE MUESTRA

La muestra de ají, objeto de este estudio, fue recolectada en las localidades de Timba y Domingullo ubicadas al norte del departamento del Cauca. La Cooperativa de Trabajo Asociado Agroindustrial y Comercial del Cauca (COAGROICA), quien se encarga de comercializar la producción y coordinar parte del funcionamiento de la cadena, suministró las variedades Tabasco y Habanero (Figura 7) en cantidad necesaria para llevar a cabo esta investigación. Las variedades escogidas son altamente comercializadas por su grado de pungencia. Las muestras suministradas presentaban un grado de maduración adecuado, evidenciado por el color rojo asociado al alto contenido de carotenoides que dan origen a la coloración.

Figura 7. Variedades empleadas en la determinación de capsantina y capsorubina



La muestra compuesta recolectada de las dos variedades, fue depositada en bolsas plásticas y fue transportada en el menor tiempo posible al Laboratorio de Investigación del Grupos Química de Productos Naturales del Departamento de Química de la Universidad del Cauca, donde fue acondicionada para los análisis y pruebas, esto se realizó para evitar la sobre maduración del fruto que afecta directamente la composición de los carotenoides de interés³⁵.

2.3 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL PIGMENTO DEL FRUTO DEL AJÍ

Cada análisis se llevó a cabo por triplicado, para obtener un promedio como resultado final.

2.3.1 Preparación del material de ensayo.

De las muestras recolectadas se seleccionaron los frutos en estado de maduración apropiado y se descartaron aquellas que presentaron sobremaduración; frutos blandos y de coloración parda, y aquellas que no cumplieron con las condiciones fitosanitarias mínimas para este estudio³⁵.

Para el desarrollo de la metodología el material de ensayo se preparó de dos formas, el fruto con semilla FF1 y el fruto sin semilla FF2, las semillas fueron extraídas manualmente

2.3.2 Determinación de propiedades físicas y análisis proximal

Antes de iniciar el proceso de optimización de la extracción y cuantificación del pigmento del fruto del ají, se determinaron las propiedades físicas³⁶ tales como color, forma, tamaño, peso y además el porcentaje de frutos defectuosos. También se realizó el análisis proximal teniendo en cuenta las metodologías descritas en la AOAC⁹, para determinar el contenido de agua, proteína, grasa, cenizas, fibra y carbohidratos totales (Tabla 5).

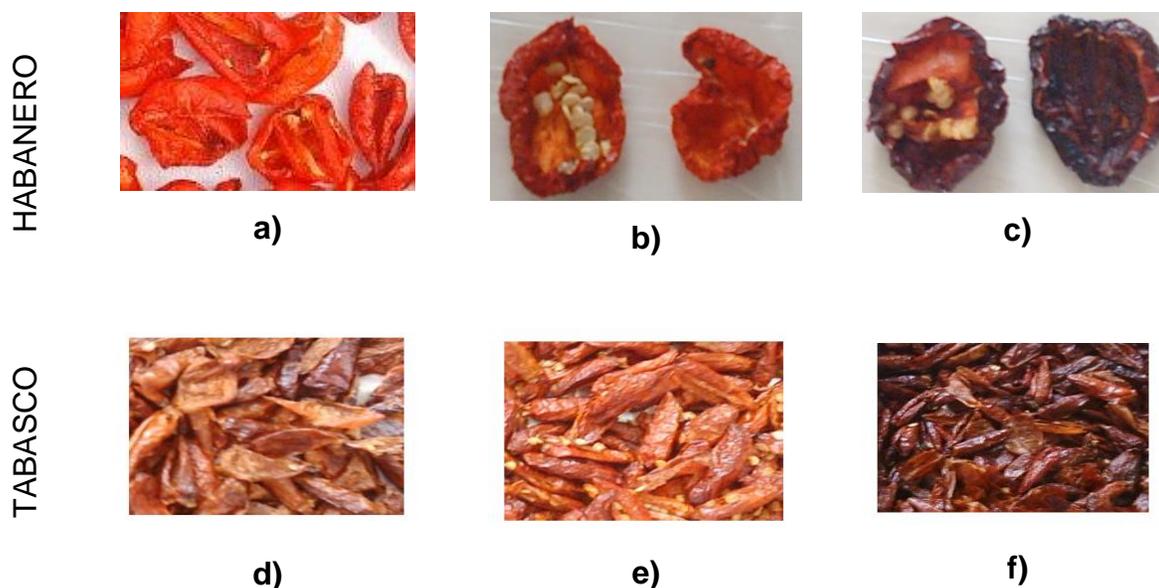
Tabla 5. Métodos para análisis proximal del fruto de ají, según la AOAC

Análisis	Método	Referencia
Humedad	Destilación	AOAC 986.21
Cenizas	Gravimétrico	AOAC 941.12
Nitrógeno	Kjeldahl	AOAC 920.165
Grasa	Soxhlet	AOAC 963.15
Fibra bruta	Digestión	AOAC 920.169

2.3.3 Proceso de secado

Las muestras con semilla y sin semilla se secaron por separado a las mismas temperaturas: 20 ± 1 °C (solar en invernadero), y 50 °C y 100 °C en estufa con ventilación, hasta que los frutos presentaron apariencia crujiente^{10,11} (Figura 8). Las muestras posteriormente fueron molidas en un molino de disco y almacenadas en recipientes de vidrio protegidos de la luz. A estas muestras se les determinó el porcentaje de humedad usando el método Dean Stark³⁷

Figura 8. Muestra de ají de la variedad Habanero y Tabasco seca a: **a)** y **d)** Temperatura ambiente, **b)** y **e)** 50 °C, **c)** y **f)** 100 °C



Determinación del color extraíble. El color del polvo de ají obtenido fue evaluado por el método de la American Spice Trade Association. (ASTA 1968 – método 20.1), extrayendo el color por percolación con acetona. La concentración en unidades ASTA se determinó por espectrofotometría a 460 nm, por comparación con una solución estándar de dicromato de potasio y sulfato de amonio y cobalto¹².

2.3.4 Obtención del pigmento del fruto del ají

La extracción de la oleorresina de las muestras deshidratadas se realizó con tres solventes de diferentes polaridades: etanol, acetona y hexano por metodologías soxhlet y percolación. Se usaron 4 g de muestra deshidratada y 90 mL de solvente extractor, para el caso de la extracción soxhlet, el solvente circuló por la cámara hasta que este no presentó la coloración roja característica. Para el desarrollo de la metodología por percolación, la muestra se sumergió en el solvente a temperatura ambiente, el cual se cambió, cada cuatro horas, durante 16 horas¹³.

Las cantidades de muestra y solvente empleadas en las dos metodologías de extracción se determinaron teniendo en cuenta el número de análisis a realizar y la cantidad de muestra total de cada una de las variedades que se estudiaron.

Los extractos obtenidos con estas dos metodologías se concentraron separadamente por rotaevaporación a temperatura y presión controlada de 30 °C y 500 mmHg, hasta la eliminación total del solvente. El contenido de pigmento extraído se determinó por pesaje directo.

Se realizaron inyecciones por triplicado de cada una de las muestras para determinar cual de los pigmentos obtenidos anteriormente contiene mayor cantidad de capsantina y capsorubina. Las muestras usadas, Tabasco y Habanero se obtuvieron con diferentes tratamientos de secado, con y sin semilla.

2.4 EVALUACIÓN DEL PIGMENTO DEL FRUTO DEL AJÍ

Se evaluó la estabilidad del pigmento en unidades ASTA, con base en parámetros de luz, acidez y temperatura.

2.4.1 Efecto de la luz ultravioleta en la estabilidad del pigmento

10 mg de pigmento fue expuesto a radiación ultravioleta (λ : 254 nm) directa mediante un tubo suspendido a una distancia de 15 cm, por diferentes periodos de tiempo correspondientes a ½, 1, 2, 3, 5, 8, 12, 24 y 48 horas. Pasado cada uno de los tiempos, a cada muestra se le determinó la concentración del color en unidades ASTA³⁸.

2.4.2 Efecto de la temperatura en la estabilidad del pigmento

La estabilidad del pigmento (10 mg) se evaluó por dos horas a 7, 25, 40, 60, y 100 °C en oscuridad^{11,39}. Finalizado este tiempo se determinó la concentración del color en unidades ASTA.

2.4.3 Efecto de la acidez en la estabilidad del pigmento disuelto en materia grasa

Para evaluar la estabilidad del pigmento frente a la acidez¹⁵, se pigmentaron muestras de 5 mL de aceite de girasol con 10 mg de pigmento extraído y se adicionó ácido acético manejando rangos de pH de 1-2, 2-3, 3-4 y 4-5. A las muestras de cada rango de pH se determinó la concentración del color en unidades ASTA.

2.5 SEPARACIÓN DE CAROTENOIDES MAYORITARIOS POR HPLC

2.5.1 Aislamiento de capsantina y capsorubina a partir del pigmento extraído

La separación de los carotenoides mayoritarios, se hizo combinando las metodologías descritas por Kim¹² y Weissenberg⁴⁰, quienes proponen la saponificación con hidróxido de potasio en metanol al 30% del pigmento extraído durante 6 horas con agitación constante. Posteriormente se llevó a cabo una extracción líquido-líquido con éter etílico, la fase etérea obtenida se lavó con agua hasta pH neutro, luego se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se rotavaporó hasta la eliminación total del solvente.

La muestra redisuelta en acetona se pasó a través de una columna de cromatografía abierta con fase estacionaria de óxido de magnesio y fase móvil acetonitrilo:metanol:acetato de etilo en proporciones 60:20:20 v/v. La fracción recolectada se concentró en un rotaevaporador al vacío, a una temperatura de 30 °C y presión de 450 mmHg. El residuo fue redisuelto en acetona y filtrado a través de una membrana de teflón de 0.45 µm antes de la inyección en el cromatógrafo de líquidos²⁹.

2.6 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE CUANTIFICACIÓN DE CAPSANTINA Y CAPSORUBINA POR HPLC

2.6.1 Condiciones experimentales.

Se estandarizaron los parámetros cromatográficos para la determinación de capsantina y capsorubina para cada una de las variedades de ají en estudio. Se establecieron condiciones óptimas para el análisis tales como: longitud de onda de trabajo, la cual se determinó realizando un barrido en el espectrofotómetro con los patrones de capsantina y capsorubina a una concentración de 2.5 ppm desde 190 a 700 nm, registrando valores cada 5 nm, además se realizó la curva de van Deemter para determinar el flujo óptimo y se estudiaron elución en gradiente e isocrática, de esta forma se encontraron las condiciones óptimas de cuantificación de capsantina y capsorubina.

2.6.2 Elección de la fase móvil.

Teniendo en cuenta, las diferentes investigaciones acerca de las condiciones para la separación y cuantificación de carotenoides mayoritarios del ají y la magnitud de las interacciones para cada solvente empleado, se optimizó el tipo de fase móvil; para ello se realizaron ensayos con diferentes fases móviles, variación de fuerzas eluotrópicas empleando la ecuación de Snyder, con el fin de establecer el método de separación y cuantificación más apropiado por HPLC^{24,16}.

Las fases móviles evaluadas fueron:

- Acetonitrilo: Etanol: Acetato de etilo (80:10:10)
- Acetonitrilo: Metanol: Acetato de etilo (76:12:12)
- Acetonitrilo: Metanol: Agua (70:20:10)
- Acetona: Agua: Metanol (75: 25:5)
- Acetonitrilo:Isopropanol: Acetato de etilo (65: 25:10)
- Acetona: Agua: Isopropanol (65:25:15)
- Acetona: Metanol: Agua (65:20:15)
- Acetonitrilo: Acetato de etilo: Metanol 80% (76:12:12)
- THF: Metanol 75%:Acetato de etilo (64:20:16)
- Acetonitrilo: Metanol 75%: THF: Acetato de etilo (67:20:8:5)

2.6.3 Método de cuantificación.

La cuantificación de carotenoides mayoritarios del pigmento del fruto del ají, se realizó por curva de calibración con patrones entre 0.1 a 0.9 ppm y 0.1 a 1.0 ppm para capsantina y capsorubina respectivamente. Con el cromatograma de cada solución, se graficó el área registrada versus la concentración de las soluciones patrón. Finalmente se registra el cromatograma de las muestras en las mismas condiciones experimentales. La concentración del analito se determina a partir del valor medido del área bajo la curva de la muestra y de la curva de calibración⁴¹.

Porcentaje de recuperación Para evaluar la eficiencia del método de tratamiento de muestra, se determinaron los porcentajes de recuperación, para lo cual se adicionó 1 mL de cada una de las soluciones estándar de capsantina y capsorubina de 0.5 ppm a la muestra de ají seco, estos reactivos se adicionaron antes de la extracción del pigmento.

2.7 ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ANÁLITICO

Esta etapa se desarrolló con el fin de obtener en forma experimental y para las condiciones particulares del laboratorio, los valores de los siguientes parámetros: linealidad, precisión (Repetitividad y reproducibilidad), sensibilidad (Límite de detección y límite de cuantificación) y exactitud.

2.7.1 Linealidad.

Para la determinación de capsantina y capsorubina se prepararon soluciones de referencia de 250 ppm para cada analito, a partir de los estándares correspondientes. Las soluciones estándar de trabajo se prepararon por dilución de las soluciones anteriores con el fin de obtener un rango de concentraciones de 0.1 a 0.9 ppm para capsantina y de 0.1 a 1.0 ppm para capsorubina. Estas soluciones de trabajo se prepararon en acetona grado cromatográfico y se almacenaron a 6 °C. Cada solución estándar de capsantina y capsorubina se midió por triplicado y a partir de los datos obtenidos de las áreas y sus respectivas concentraciones, se trazaron las curvas de calibración correspondientes.

2.7.2 Precisión.

Con el fin de observar el grado de concordancia entre los datos individuales y la repetitividad de la técnica, cada punto de la curva se midió por triplicado determinándose la desviación estándar (s) y la desviación estándar relativa (RSD).

Después de un corto periodo de haber sido analizadas los patrones de cada carotenoide, se evaluó la desviación estándar relativa de tres soluciones patrón de capsantina y capsorubina de diferente concentración cada segundo día por espacio de 15 a 20 días, con el fin de determinar la reproducibilidad del método analítico.

2.7.3 Sensibilidad.

Para calcular el límite de detección LD y el límite de cuantificación LC⁴² de capsantina y capsorubina, fue necesario construir una curva de calibración adicional con un rango de concentración menor, 0.025 a 0.1 ppm y 0.01 a 0.1 ppm respectivamente. Cada punto de las curvas se midió por triplicado y de ésta manera se calculó la mínima concentración de capsantina y capsorubina detectable y cuantificable por el método de HPLC.

2.7.4 Exactitud.

La exactitud se calculó, evaluando la recuperación porcentual de capsantina y capsorubina a partir de las curvas de trabajo empleadas para determinar la linealidad del método; las cuales tienen un rango de concentración desde 0.1 hasta 0.9 ppm para capsantina, y desde 0.1 hasta 1.0 ppm para capsorubina.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL PIGMENTO DEL FRUTO DEL AJÍ

3.1.1 Determinación de propiedades físicas y análisis proximal

Los datos obtenidos con respecto a las propiedades físicas y al análisis proximal de los frutos de ají con semilla y sin semilla de las dos variedades trabajadas: Tabasco y habanero se indican en las tablas 6 y 7.

Tabla 6. Propiedades físicas del fruto de ají variedad tabasco y habanero

Propiedad	Valores	
	Tabasco	Habanero
Tamaño	2.8 ± 0.4 cm	3.6 ± 0.4 cm
Peso	0.78 g	7.6 g
Color	Rojo	Rojo
Forma	Cónica	Corazonada
Pulpa	62.36 %	87.67 %
Semilla	37.64 %	12.33 %
Frutos defectuosos	4.73 %	5.04 %

Las propiedades organolépticas de los frutos de ají de las variedades tabasco y habanero difieren entre si debido a que están sujetas a las características propias de su variedad. En la tabla 6, se relacionan los resultados con respecto al tamaño, peso, forma y color de los frutos utilizados. Es importante resaltar la coloración roja que alcanzan ambos frutos en su máximo estado de madurez siendo esta una variable fundamental en la extracción de los pigmentos mayoritarios capsantina y capsorubina, ya que en este grado de maduración se encuentran en mayor concentración.

Tabla 7. Análisis proximal de frutos de ají (100 g de muestra húmeda)

Análisis	Tabasco		Habanero	
	FF1	FF2	FF1	FF2
Humedad ¹	66.23	71.44	79.98	77.83
Humedad ²	71.68	81.41	87.57	89.46
Materia seca	28.32	18.59	12.43	10.53
Ceniza	1.89	2.10	0.94	0.91
Proteína	2.94	1.77	1.68	1.25
Extracto etéreo	1.32	1.89	3.44	5.15
Fibra fruta	14.33	4.58	2.65	1.06
Carbohidratos totales	22.17	12.83	9.37	3.23

¹ Determinación por deshidratación en estufa a 80° C

² Determinación por Dean stark

FF1: Fruto fresco con semilla, FF2: Fruto fresco sin semilla

En cuanto a la composición proximal (tabla 7, gráfico 2– anexo I), los frutos de ají de las dos variedades, fueron analizados como frutos frescos incluyendo la variable de frutos frescos con semillas (FF1) y sin semillas (FF2). Al comparar los resultados de una misma variedad con y sin semilla se observa en general un incremento del porcentaje de humedad y el porcentaje de extracto etéreo en los frutos exentos de semillas, debido a que las semillas no son fuente evidente de humedad. Un incremento en el valor obtenido para el extracto etéreo en estas muestras puede ser el resultado de un mayor contenido de compuestos apolares en la pulpa del fruto del ají, tales como los carotenoides responsables del color y de los cuales el ají es fuente importante.

Los análisis restantes arrojaron valores mayores en las muestras con semillas, lo que implica que ellas son fuente de estos nutrientes. De estos datos cabe destacar el porcentaje de proteína y fibra bruta, ya que las semillas por su función, presentan porcentajes altos de proteína que permiten el proceso de germinación y son fuente de polisacáridos (Celulosa, ligninas, etc), que constituyen la fracción insoluble de los carbohidratos totales, es decir, la fibra bruta.

Si se compara la composición proximal de las dos variedades, tabla 7, (Gráfico 2 – anexo I) y teniendo en cuenta que los frutos de la variedad tabasco presentan mayor porcentaje de semillas y menor porcentaje de pulpa, tabla 6 (Gráfico 1- anexo I) en relación con los frutos de la variedad habanero, se puede justificar el incremento en los porcentajes de ceniza, proteína y fibra con la presencia del mayor contenido de semillas, debido a que son fuente de compuestos que elevan los porcentajes en estos nutrientes. Contrario sucede con aquellos parámetros dependientes del contenido de pulpa como lo es la humedad y el extracto etéreo, para los cuales el valor es menor por presentar menor porcentaje de esta comparada con la otra variedad.

3.1.2 Proceso de secado

Los tiempos de los diferentes tratamientos de secado empleados, su porcentaje de humedad residual y el color extraíble medido en unidades ASTA se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Tiempo empleado en los diferentes tratamientos de secado y contenido de humedad y color extraíble de las muestras deshidratadas.

Variedad	Procedimiento de secado	Tiempo (h: min.).		% Humedad residual*		Color extraíble (ASTA)*	
		FS1	FS2	FS1	FS2	FS1	FS2
Tabasco	Solar	134:00	47:00	10.54	13.32	156	446
	50 °C	42:50	23:15	1.17	1.33	150	496
	100 °C	6:25	4:39	1.33	1.33	198	485
Habanero	Solar	216:00	216:00	11.67	11.67	182	365
	50 °C	56:50	56:50	5.31	2.67	226	408
	100 °C	12:00	12:00	2.66	2.66	273	450

FF1: Fruto fresco con semilla, FF2: Fruto fresco sin semilla, FS1: Fruto seco con semilla, FS2: Fruto seco sin semilla

*Desviación estándar menor 1%

Se evaluaron tres procesos de secado para las dos variedades de ají trabajadas, correspondientes a deshidratación a temperatura ambiente (19.8 °C HR ≤ 81%), y 50 °C y 100 °C en estufa. Los parámetros de evaluación para este proceso fueron

tiempo, porcentaje de humedad residual y color extraíble en cada una de las muestras obtenidas en estos tratamientos.

En los tiempo de secado se registraron los mayores valores para las muestras tratadas a temperatura ambiente, seguidos del tratamiento a 50 °C y finalizando con el tratamiento a 100 °C, tabla 8, (Gráfico 3-Anexo I). Los resultados están relacionados inversamente con las temperaturas del proceso, es decir a mayor temperatura menor tiempo, ya que la evaporación del agua se lleva a cabo más rápido cuando la temperatura se acerca a su punto de ebullición, donde las moléculas de agua tienden a estar mas alejadas y en mayor movimiento, lo que causa, que los enlaces de hidrogeno formados con otras moléculas de agua y con otras moléculas componentes del fruto de ají (azúcares, minerales, colorantes, etc.), se rompan y se liberen las moléculas de agua en forma de vapor. El tiempo de secado en las muestras tratadas a temperatura ambiente se incrementa a causa de las irregularidades en la iluminancia, debido a que la fuente calórica (la energía solar) llega irregularmente, principalmente cerca a la noche, en los intervalos nublados y además por las variaciones de la humedad relativa y la temperatura ambiental.

La acción combinada de estas últimas, contribuye notablemente en la duración de la operación de secado, al ocasionar el retardo de la migración del agua desde el material vegetal, antes de alcanzar el equilibrio entre la humedad del aire y la del producto.

Otro parámetro de evaluación, fue el porcentaje de humedad residual, es decir el porcentaje con el que queda la muestra después del tratamiento de secado. En la tabla 8, (Gráfico 4–anexo I), se observa que los porcentajes de humedad más altos en las dos variedades corresponden al secado solar. Estos resultados son debidos a que las muestras deshidratadas a temperatura ambiente en el proceso deben alcanzar un equilibrio con el medio, al tener la ciudad de Popayán (Cauca) una humedad relativa alta ($\leq 81\%$) el equilibrio se alcanza a valores de porcentaje de humedad altos, lo que explica los mayores resultados mediante este procedimiento.

Contrario ocurre con las muestras de tratamiento de secado a 50 °C y 100 °C el cual se llevó a cabo en estufa con sistema de ventilación, que permite que la humedad relativa del ambiente sea baja y por lo tanto los valores del porcentaje de humedad residual son menores.

La determinación de color ASTA se realizó sobre las muestras de ají de las dos variedades luego del proceso de secado, en la tabla 8 (Gráfico 5-anexo I), se observa que los mayores valores de unidades ASTA son para las muestras sin semillas en las dos variedades, siendo ligeramente mayor para la variedad tabasco. Esto permite deducir que las semillas en estas variedades no son fuente de carotenoides, por lo cual su presencia no aporta en el valor de las unidades ASTA. La gráfica 5 (Anexo I), muestra un resultado importante relacionado con el porcentaje de semilla para cada variedad; tabasco que es la variedad con mayor contenido de semilla, presenta valores en unidades ASTA menores que los obtenidos para el ají habanero, confirmando de esta manera que las semillas no proporcionan color extraíble.

3.1.3 Obtención del pigmento del fruto del ají

En la estandarización de la obtención del pigmento del ají se emplearon las metodologías soxhlet y percolación, en ellas se evaluaron parámetros como el tiempo de extracción y el porcentaje de pigmento obtenido, datos que se muestran en las tablas 9 y 10.

La finalidad de evaluar las variables ya citadas en la extracción fue determinar con cual de ellas se obtiene mayor cantidad de pigmento y evaluar cual produce el pigmento con mayor contenido de los carotenoides: Capsantina y capsorubina.

Tabla 9. Tiempo (horas:minutos) empleado en la extracción soxhlet y percolación

Proceso extracción	Variedad	Secado	ETANOL		ACETONA		HEXANO	
			FS1	FS2	FS1	FS2	FS1	FS2
SOXHLET	Tabasco	Solar	9:00	9:00	5:25	5:25	4:00	6:40
		50 °C	7:30	7:30	6:00	5:25	4:00	5:00
		100 °C	8:00	8:00	5:40	5:30	4:00	4:00
	Habanero	Solar	8:30	8:15	9:10	8:40	4:40	5:40
		50 °C	11:00	8:40	7:00	8:00	5:30	10:10
		100 °C	11:00	8:40	7:00	8:00	5:30	10:10
PERCOLACIÓN	Tabasco	El tiempo de extracción para las muestras de los diferentes secados correspondió a 16 h						
	Habanero							

Tabla 10. Porcentajes (% p/p) de pigmento extraído por metodología soxhlet y percolación

Proceso extracción	Variedad	Secado	ETANOL		ACETONA		HEXANO	
			FS1	FS2	FS1	FS2	FS1	FS2
SOXHLET*	Tabasco	Solar	18.37	22.98	16.89	23.50	5.29	11.66
		50 °C	14.44	28.47	9.69	13.20	8.82	11.51
		100 °C	14.56	24.65	9.72	13.28	10.29	11.73
	Habanero	Solar	26.11	38.77	17.94	24.60	8.72	9.68
		50 °C	32.27	27.84	7.45	4.36	6.66	5.32
		100 °C	27.65	34.46	12.66	5.02	5.12	6.84
PERCOLACIÓN*	Tabasco	Solar	15.88	31.39	12.16	16.26	9.50	10.77
		50 °C	28.39	42.27	14.37	15.39	11.64	11.64
		100 °C	27.45	42.65	16.09	16.28	15.16	13.30
	Habanero	Solar	15.11	15.45	14.37	16.65	4.03	4.12
		50 °C	15.60	15.63	6.91	12.91	4.45	3.72
		100 °C	16.34	17.91	9.54	13.46	7.16	7.94

* La desviación estándar relativa de los datos se encuentra entre 0.02- 3%

Los resultados obtenidos en esta evaluación, tabla 9 y 10, (Gráfico 6 y 7 – anexo I), muestran que el etanol es el solvente que mayor porcentaje de pigmento extrajo,

seguido de acetona y hexano, tanto en la metodología soxhlet como en la de percolación. Además en forma general las extracciones realizadas sobre los frutos sin semilla tienen mejores rendimientos que las observados en los frutos con semilla, este resultado reafirma que las semillas no contribuyen al porcentaje de pigmento extraído.

En cuanto a las dos metodologías se pudo observar que es más eficiente el proceso soxhlet, ya que extrae mayor pigmento en menor tiempo comparado con la metodología por percolación. Este resultado se fundamenta en que en el proceso de extracción soxhlet hay renovación continua de solvente contrario a lo que sucede con la percolación donde el solvente se satura y posteriormente es reemplazado varias veces a un mismo intervalo, lo que conlleva a un gasto mayor de solvente y tiempo.

De las muestras extraídas, los mayores rendimientos se presentan en muestras de la variedad habanero sin semilla secas a temperatura ambiente, seguidas muy cerca de las extracciones en las mismas condiciones pero de muestras deshidratadas a 50 °C en estufa. Es importante tener en cuenta que con acetona, etanol y hexano en el proceso de extracción donde se obtiene el pigmento también hay extracción de capsaicina (componente pungente) presente en el fruto, debido a la miscibilidad de esta molécula con cada uno de los solventes⁴³, en etanol mayor que en acetona y hexano, esto se evidencia además, por la sensación de ardor al manipular el pigmento.

Mediante HPLC se determinó cual de los pigmentos posee mayor cantidad de carotenoides, para esto se emplearon los pigmentos obtenidos en la extracción soxhlet y percolación de muestras con y sin semilla que previamente han sido tratadas, parámetro evaluado en las dos variedades de estudio.

Teniendo en cuenta que el área bajo la curva es proporcional a la concentración, en las figuras 9 y 10 se relaciona las áreas de los extractos con y sin semilla con respecto a las temperaturas de secado empleadas con cada solvente; como

resultado predominante se observa que la acetona es el solvente que extrae en mayor cantidad estos componentes en muestras sin semilla tratadas a temperatura ambiente y por metodología soxhlet.

El análisis de los datos se hizo con el test estadístico, en el que se calculó el valor de t para cada solvente a las tres temperaturas de secado en muestra con y sin semilla arrojando valores mayores en todos los casos al compararlo con el t_{tab} a un 95 % de confianza y $n-2$ grados de libertad, lo que indica una diferencia significativa entre los diferentes tratamientos realizados a la muestra.

Figura 9. Efecto de los diferentes tratamientos de secado, solvente extractor y contenido de semilla sobre la cantidad de capsantina y capsorubina para la variedad Habanero a) Metodología soxhlet, b) Metodología de percolación; (----) con semilla y (—) sin semilla

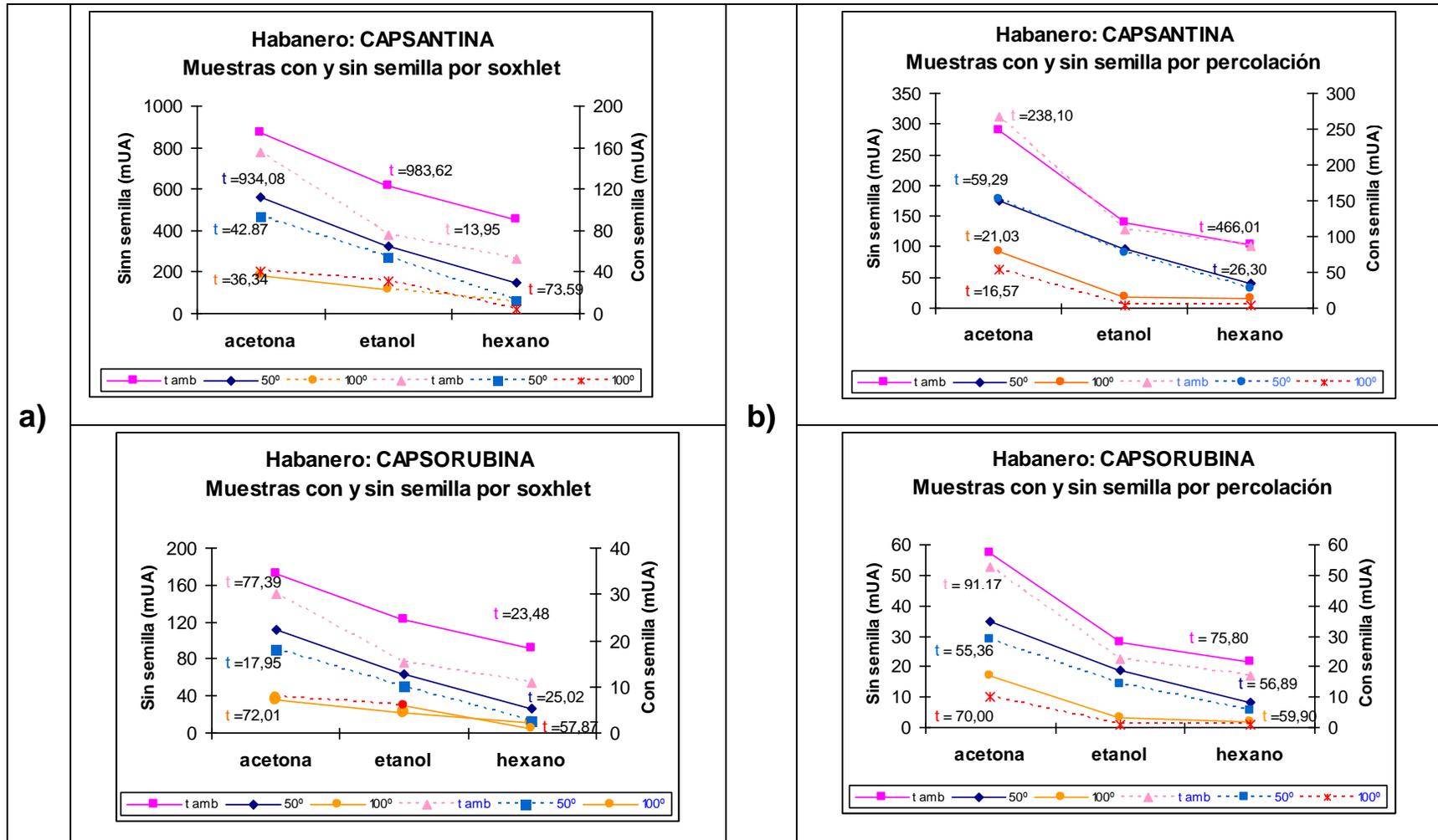
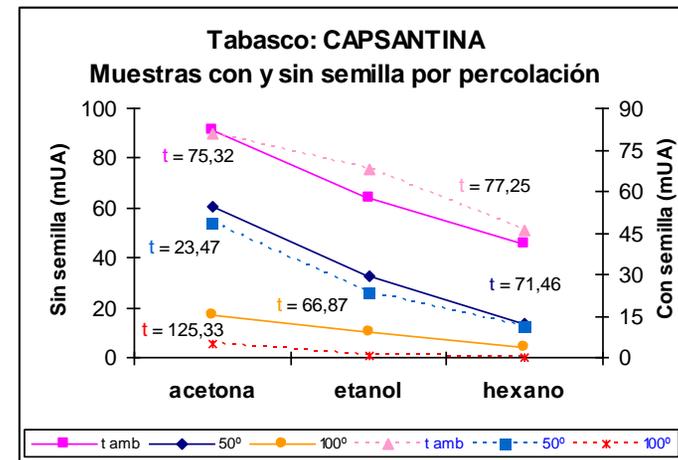
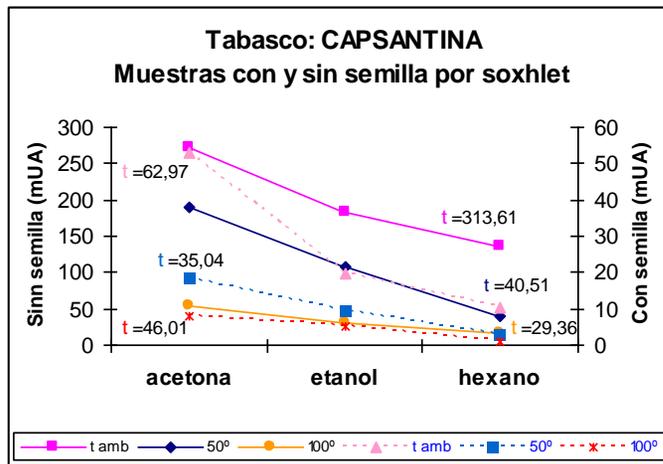
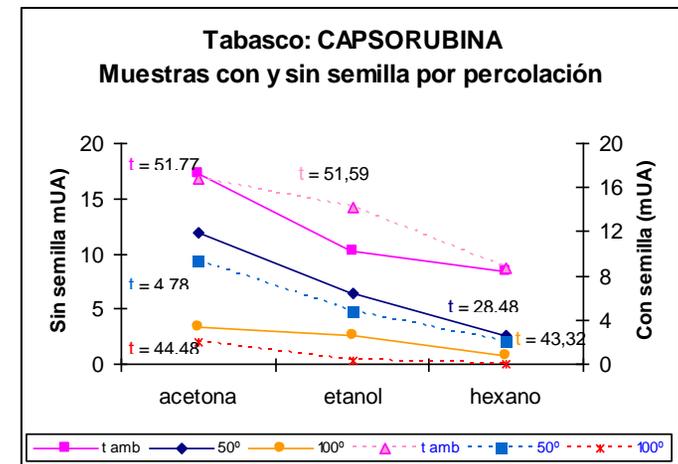
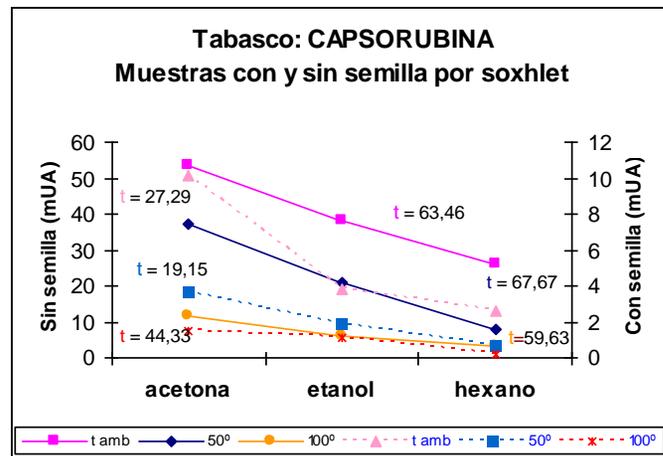


Figura 10. Efecto de los diferentes tratamientos de secado, solvente extractor y contenido de semilla sobre la cantidad de capsantina y capsorubina para la variedad Habanero a) Metodología soxhlet, b) Metodología de percolación; (----) con semilla y (—) sin semilla



a)

b)



De acuerdo a lo anterior la acetona es la que mayor cantidad de carotenoides mayoritarios extrae, esto se debe a la gran afinidad que presenta la acetona por ellos, hecho que esta relacionado con la polaridad del solvente, lo que permite que los carotenoides capsantina y capsorubina, xantofilas, sean más solubles en ella, que en etanol o hexano.

Además la acetona en la extracción soxhlet no permite que la temperatura de los componentes este por encima de 56 °C que corresponde a su punto de ebullición, contrario a lo que sucede con el etanol (79 °C) y el hexano (69 °C), que con mayores puntos de ebullición exponen a los carotenoides y permiten mas fácilmente la degradación.

Los resultados aquí obtenidos fueron la base para escoger la acetona como el solvente adecuado para la extracción de los carotenoides mayoritarios. Con respecto a esto, las cuantificaciones posteriores se realizaron sobre los pigmentos obtenidos de la variedad tabasco y habanero sin semilla deshidratados a temperatura ambiente y extraídos mediante metodología soxhlet con acetona (figura 11 a la 14).

Las tablas 31 a 34 (Anexo III) exhiben los datos estadísticos que muestran una diferencia significativa entre las dos metodologías de extracción empleadas.

Figura 11. Comparación de cromatogramas de las extracciones con acetona (----), etanol (----) y hexano (----) en muestras de ají sin semilla por extracción soxhlet para la variedad habanero. Condiciones experimentales: Tabla 12

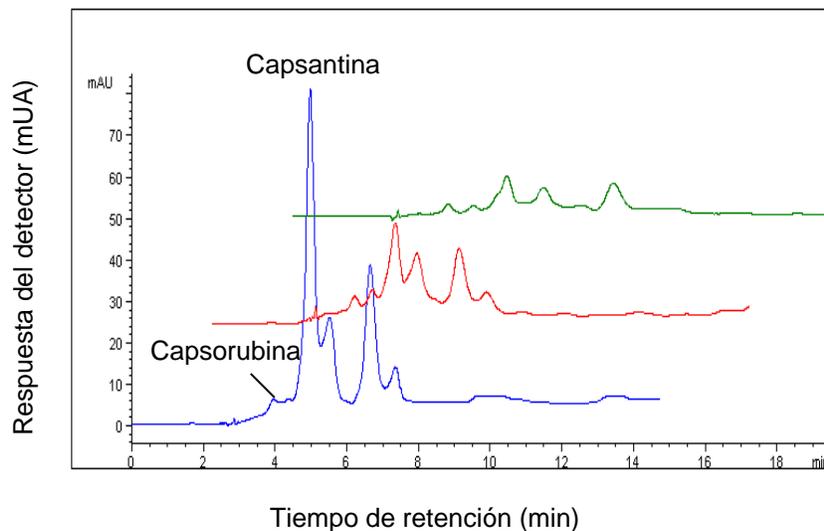


Figura 12. Comparación de cromatogramas de las extracciones en muestras con semilla (----) y sin semilla (----), por extracción soxhlet para la variedad habanero. Condiciones experimentales: Tabla 12

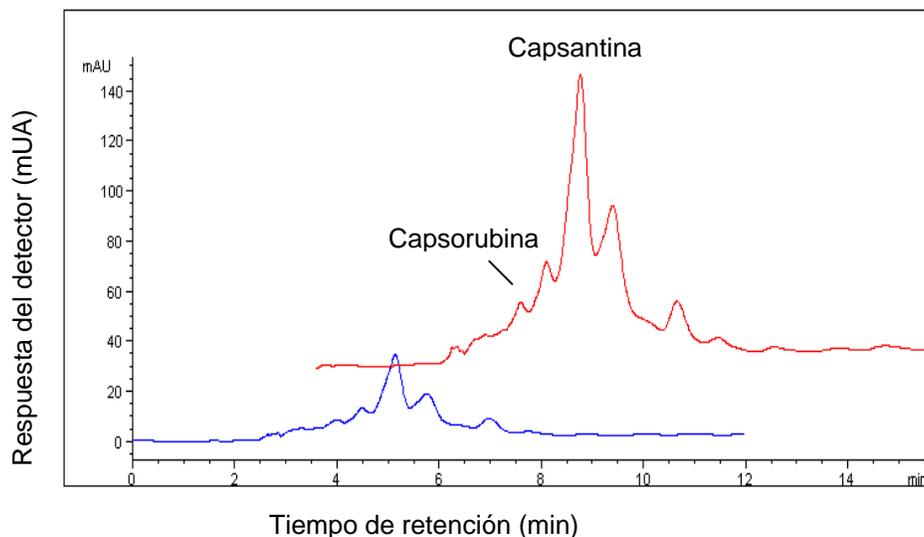


Figura 13. Comparación de cromatogramas de las extracciones soxhlet en muestras sin semilla a diferentes temperaturas de secado; temperatura ambiente (----), 50 °C (-----), y 100 °C (-----) para la variedad habanero. Condiciones experimentales: Tabla 12

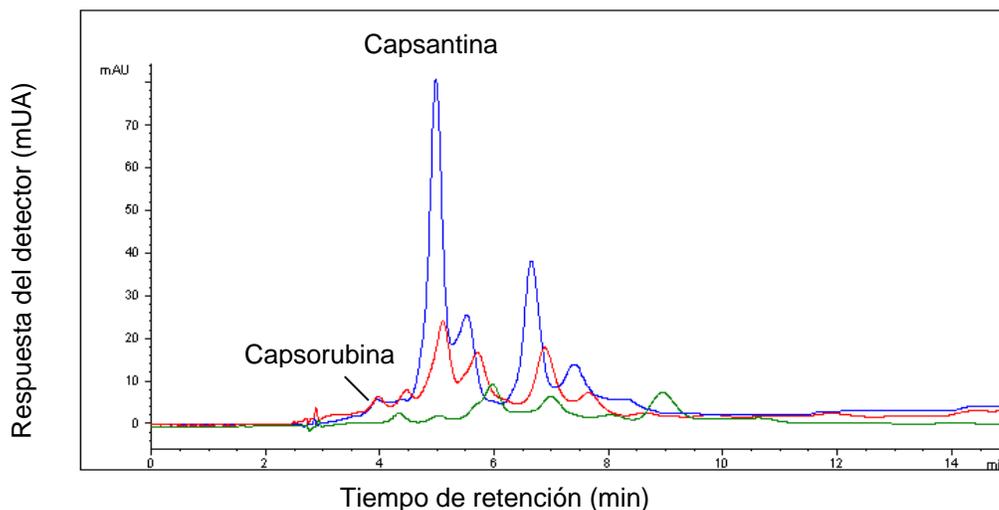
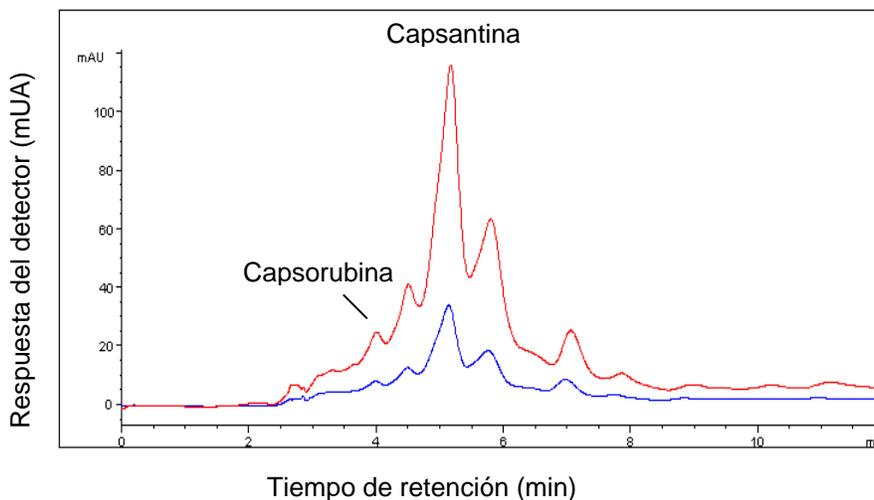


Figura 14. Comparación de cromatogramas de las extracciones con acetona por metodología soxhlet en muestras deshidratadas a temperatura ambiente sin semilla para la variedad tabasco (----) y la variedad habanero (-----). Condiciones experimentales: Tabla 12



3.2 EVALUACIÓN DEL PIGMENTO DEL FRUTO DEL AJÍ

Los parámetros evaluados sobre el pigmento: luz, acidez y temperatura son relacionados en la tabla 11.

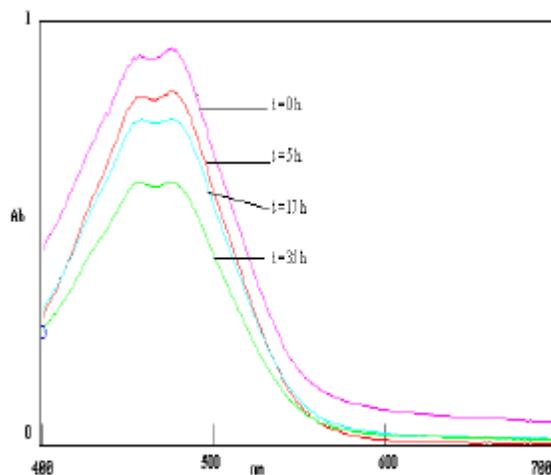
Tabla 11. Evaluación de la estabilidad del pigmento extraído

PARAMETRO	TRATAMIENTO	ABSORBANCIA	ASTA
Temperatura (°C)	Blanco	0.433	2631
	7	0.429	2630
	25	0.405	2675
	40	0.310	2530
	60	0.419	2048
	100	0.329	1746
pH	Blanco	0.303	2631
	4-5	0.365	2628
	3-4	0.452	2625
	2-3	0.485	2628
	1-2	0.558	2620
Luz UV λ: 254 nm (h)	Blanco	0.523	2648
	½	0.387	2587
	1	0.535	2079
	2	0.441	2078
	3	0.475	2117
	5	0.416	2033
	8	0.411	1998
	12	0.375	1714
	24	0.359	1775
	48	0.330	1558

El análisis de estos datos (Gráfica 8 – 9 y 10 – anexo I) muestra como estos parámetros afectan al pigmento extraído, lo cual se monitoreó mediante la determinación del color extraíble (Unidades ASTA). Tanto la temperatura como la luz U.v, degradan el pigmento lentamente a medida que aumenta la temperatura o la

exposición a la luz U.v, $\lambda = 254$ nm, respectivamente. Esto es debido a que los dobles enlaces conjugados de la moléculas de carotenoides son muy reactivos, pudiendo por la presencia de oxígeno del medio y junto con estos parámetros degradarse afectando de esta manera las dobles ligaduras, la conjugación y como consecuencia el color reflejado. Según Vicente y colaboradores⁴⁴, la radiación U. v ocasiona un daño irreversible sobre los carotenoides después de un tiempo prolongado de irradiación a una temperatura de almacenamiento de 10 °C, desarrollando pérdida del color rojo. En otro estudio de degradación de pigmentos, Montiel y colaboradores⁴⁵ reportan un espectro de absorción (Figura 15) donde se observa la notoria disminución de la concentración de carotenoides con el tiempo de exposición a la radiación UV.

Figura 15. Espectro de absorción de un extracto acetónico (80 acetona: 20agua) de las muestras de puré de pimientos rojos.



En cuanto al efecto del pH, no existe una variación tan marcada en el color extraíble (ASTA), es decir, se mantuvo constante frente a los cambios de pH. La estabilidad mostrada por el pigmento frente a este parámetro es un resultado importante en cuanto a su posible uso en diferentes materias primas o en procesos donde existan variaciones de pH, como en refrescos o zumos de frutas. Sin embargo, es importante resaltar, que aunque los carotenoides extraídos o no, son relativamente resistentes a valores de pH extremos, los ácidos y los álcalis pueden provocar isomerizaciones

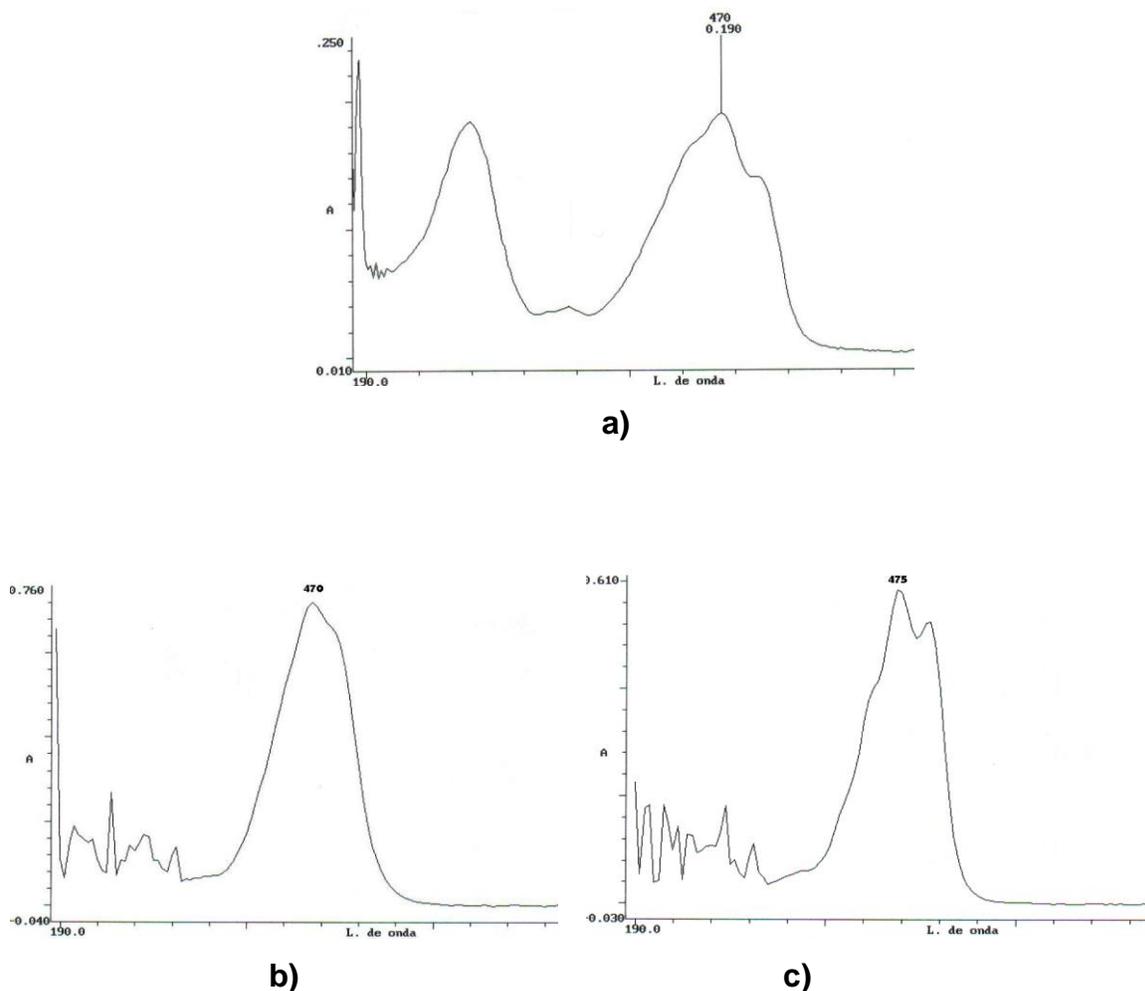
cis/trans de ciertos dobles enlaces, reagrupamientos y desesterificaciones, lo cual debe ser tenido en cuenta a la hora de manipularlos en el laboratorios para fines analíticos e industriales⁴⁶.

3.3 SEPARACIÓN POR HPLC DE CAROTENOIDES MAYORITARIOS

3.3.1 Aislamiento de capsantina y capsorubina a partir del pigmento extraído.

El aislamiento de los carotenoides mayoritarios a partir del pigmento extraído, se realizó mediante saponificación con hidróxido de potasio, proceso en el cual se eliminan lípidos y clorofilas presentes en el extracto, además de producir la hidrólisis de los ácidos grasos mono y diesterificados de capsantina y capsorubina²⁴. Posteriormente se lleva a cabo una extracción líquido – líquido con la cual se separan los carotenoides mayoritarios de otros componentes más solubles en la otra fase, como son carotenoides de mayor polaridad con la fase metanolica y aquellos apocarotenoides que se obtienen después del proceso de saponificación. Este proceso de aislamiento termina con el paso de este crudo a través de una columna abierta con fase estacionaria óxido de magnesio y una fase móvil acetonitrilo: metanol: acetato de etilo en proporciones 60:20:20 v/v, con lo que se consigue una fracción mas limpia, de carotenoides mayoritarios. La figura 16 ilustra el espectro de UV-Vis de la fracción obtenida al finalizar el proceso de aislamiento. De acuerdo a los espectros UV-Vis de los patrones, se determina que la fracción contiene capsantina y capsorubina.

Figura 16. Espectro UV-Vis **a)** de la fracción limpia obtenida a partir del extracto de ají, patrones estándar de 2.5 ppm de **b)** capsantina, y **c)** capsorubina



Teniendo en cuenta lo discutido anteriormente acerca de los tratamientos que ha tenido la muestra con la que se obtuvo la fracción a inyectar en el cromatógrafo, se concluye que para el aislamiento de carotenoides de matrices complejas como lo es el fruto del ají se necesita de precaución, para evitar la isomerización y oxidación de los mismos durante el análisis, ya que los procesos de secado, molienda, extracción soxhlet, saponificación pueden causar daño y/o errores en el contenido real de carotenoides. El efecto del proceso de secado está directamente relacionado con la concertación de carotenoides en el fruto¹¹, de acuerdo a Mínguez-Mosquera un proceso de secado lento y suave como lo es la deshidratación a temperatura

ambiente, no afecta considerablemente el contenido de carotenoides en el fruto, como tampoco lo afecta la molienda en el caso de frutos sin semilla.

Es importante anotar que la fracción aislada de carotenoides mayoritarios contiene capsaicina, esto se demostró al realizar cromatografía en placa delgada de la fracción frente a un patrón de esta sustancia, la fase móvil empleada fue diclorometano: acetato de etilo (4:2)⁴³, se observó que uno de los compuestos separados en la fracción absorbe a una longitud de 254 nm, longitud a la cual ella absorbe.

3.4 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE CUANTIFICACIÓN DE CAPSANTINA Y CAPSORUBINA POR HPLC

Para la estandarización del método de cuantificación por HPLC, primero se establecieron las condiciones de trabajo óptimas para lograr una metodología adecuada en la identificación de los carotenoides mayoritarios por cromatografía de líquidos en matrices complejas como son los frutos de ají, los cuales se potencian como un cultivo agroindustrial altamente aprovechable debido a su composición.

3.4.1 Condiciones experimentales.

La sensibilidad, definición y resolución de los picos obtenidos para capsantina y capsorubina en los frutos de ají dependen de diferentes parámetros cromatográficos experimentales que se varían para mejorar la señal cromatográfica.

El flujo se determinó por curva de van Deemter (Grafico 11, Tabla 30- Anexo I) inyectando una solución estándar de capsantina y capsorubina a diferentes flujos, la altura de plato teórico, encontrada con los tiempos de retención y anchos de pico, se grafica versus el flujo. La curva de van Deemter es propia para cada columna y para cada fase móvil, ya que cada uno de los términos implicados en la ecuación dependen del soluto, características de la fase estacionaria, el tipo de interacción y

equilibrios dados entre el soluto y la fase estacionaria. El flujo óptimo obtenido fue de 0,8 mL/ min sacrificando algunos platos teóricos y con el cual se observó mejor resolución.

Las condiciones cromatográficas seleccionadas en el proceso de estandarización del método de cuantificación por HPLC están reportadas en la tabla 12.

Tabla 12. Condiciones empleadas en el análisis por Cromatografía de Alta Resolución (HPLC)

Parámetro	Características
Detección	Visible λ : 473
Elusión	Isocrática
Flujo	0.8 mL/min
Columna	Hypersil ODS C ₁₈ (250mm x 4 mm x 5 μ m)
Fase Móvil	AE:ACN:THF:MeOH (75%) 67:8:5:20 v/v
Tiempo de retención	Capsorubina: 4.1 min. - Capsantina: 5.1 min.

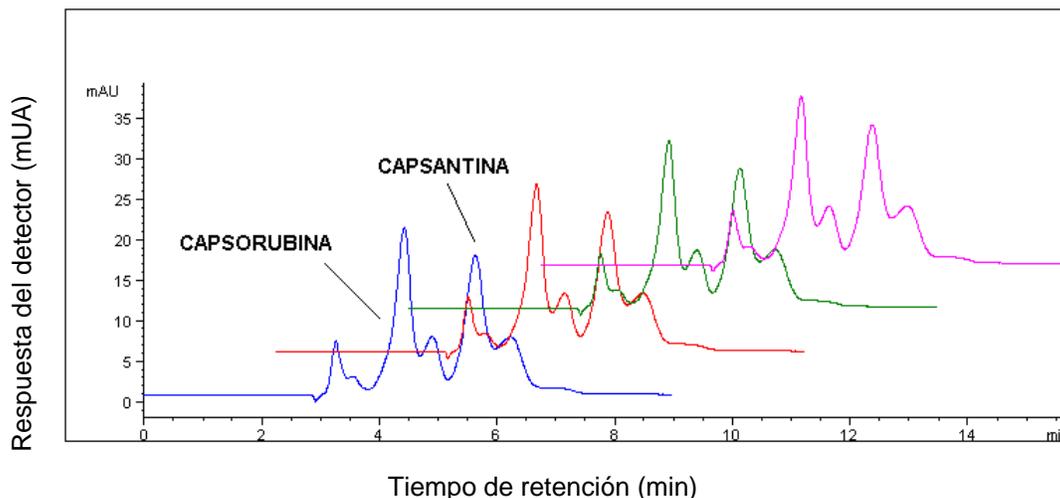
3.4.2 Elección de la fase móvil.

La elección de la fase móvil es uno de los factores que afectan en gran parte la selectividad de un sistema cromatográfico, la selectividad de ésta depende del tipo de interacción de la misma con la muestra. Las interacciones pueden ser de tipo dispersivo, dipolar, enlaces de hidrógeno, entre otras, por lo que no sólo la “polaridad” sino la suma de todas estas propiedades es la que define la afinidad de la fase móvil empleada por el analito.

De acuerdo a las características medianamente polares de capsantina y capsorubina se evaluaron diferentes fases móviles para determinar cual de ellas permitía mejor resolución de los picos de interés, en la tabla 29 (Anexo I), se relacionan varias combinaciones de solventes utilizados como eluentes, las características de separación con esta fase móvil y el cromatograma correspondiente. Con respecto a

los datos observados en este cuadro, se seleccionó la fase móvil acetonitrilo:tetrahidrofurano: acetato de etilo: metanol (75%), en proporción 67:8:5:20 v/v, que presentó las mejores características en cuanto a resolución, intensidad y simetría de picos de los carotenoides de análisis (Figura 17), por lo que es posible deducir que la capsantina y la capsorubina presentan determinadas características dipolares, aceptoras o donadoras de protones que permiten que la fase móvil presente mayor afinidad por ellas.

Figura 17. Cromatograma tridimensional de los patrones de capsantina y capsorubina inyectados cuatro veces bajo las condiciones resumidas en el tabla 12.



3.4.3 Método de cuantificación.

La cuantificación de las fracciones aisladas se realizó mediante curva de calibración, midiendo por triplicado el área de cada solución estándar de capsantina y capsorubina de menor a mayor concentración.

Las figuras 18 y 19 son los cromatogramas de capsantina y capsorubina de las concentraciones empleadas en la curva de calibración, donde se observa una buena resolución y sensibilidad entre los picos.

Figura 18. Cromatograma de las soluciones estándar de capsantina empleadas en la curva de calibración. Condiciones experimentales: Tabla 12. Concentraciones y áreas: Tabla 14

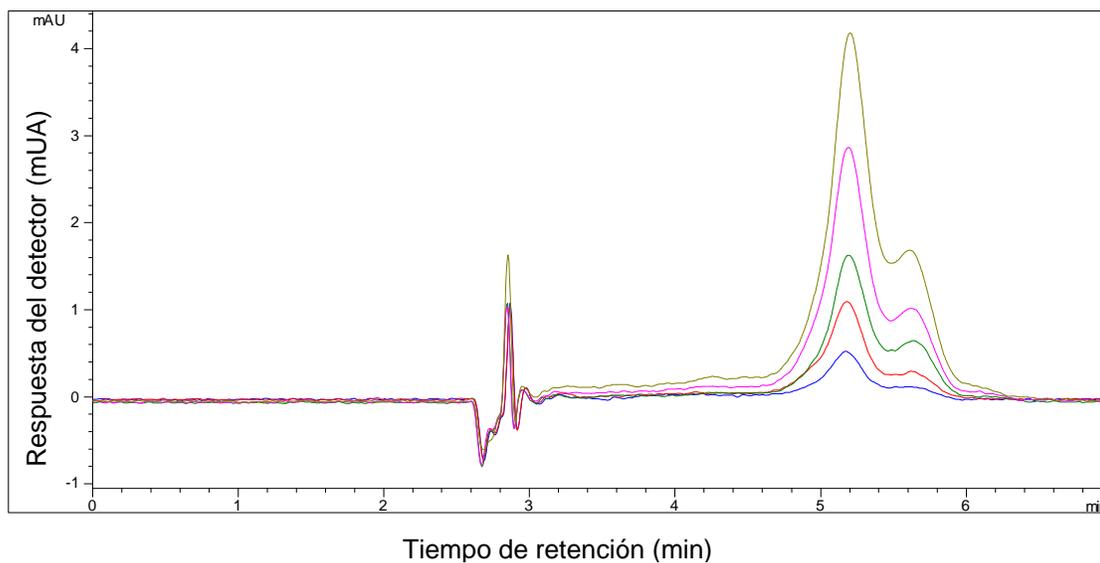
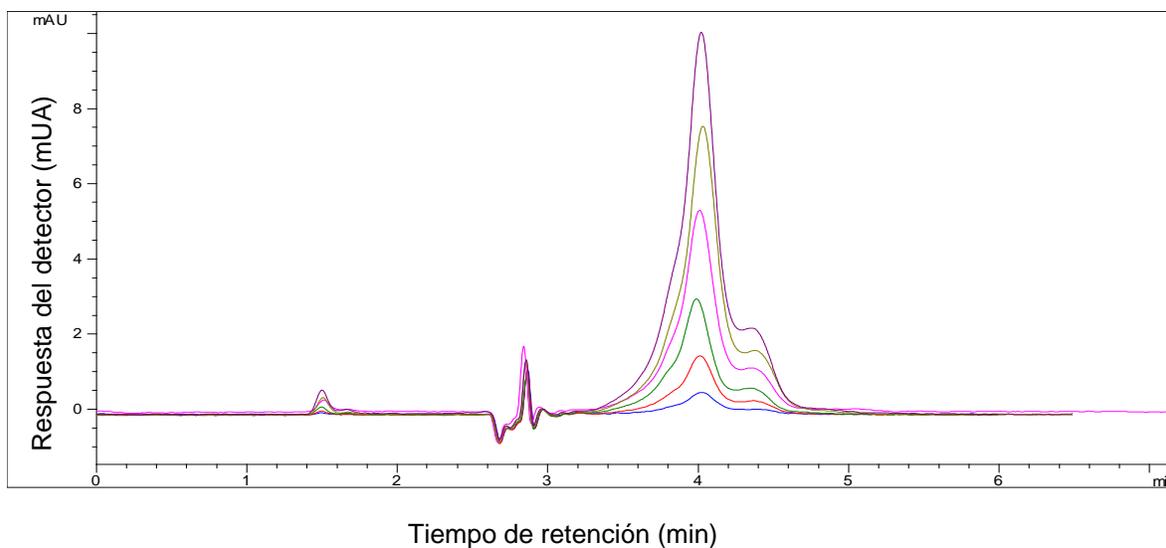


Figura 19. Cromatograma de las soluciones estándar de capsorubina empleadas en la curva de calibración. Condiciones experimentales: Tabla 12. Concentraciones y áreas: Tabla 15



3.5 ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

La estandarización del método cromatográfico permite establecer los límites prácticos de la técnica y la metodología empleada, además asegurar la precisión y exactitud de los datos obtenidos. Para tal efecto se emplean los enunciados y definiciones del anexo II.

3.5.1 Linealidad.

Se realizó una curva para capsantina y capsorubina en la que se grafica el área en función de la concentración de cada una de las soluciones estándar, donde el área bajo la curva es proporcional a la concentración. Las curvas se construyeron teniendo en cuenta los parámetros cromatográficos y experimentales especificados en la tabla 12 (sección 3.4.1 Condiciones experimentales).

Las curvas de cuantificación de capsantina y capsorubina se encuentran en un rango de concentración entre 0.1 y 0.9 ppm para capsantina y 0.1 y 1.0 ppm para capsorubina, estas concentraciones corresponden a niveles adecuados de determinación de carotenoides debido a que a mayores concentraciones tienden retenerse en la columna cromatográfica⁴⁷.

Figura 20. Curva de calibración para la determinación de capsantina en frutos de ají. Condiciones experimentales: Tabla 12. Concentraciones y áreas: Tabla 13

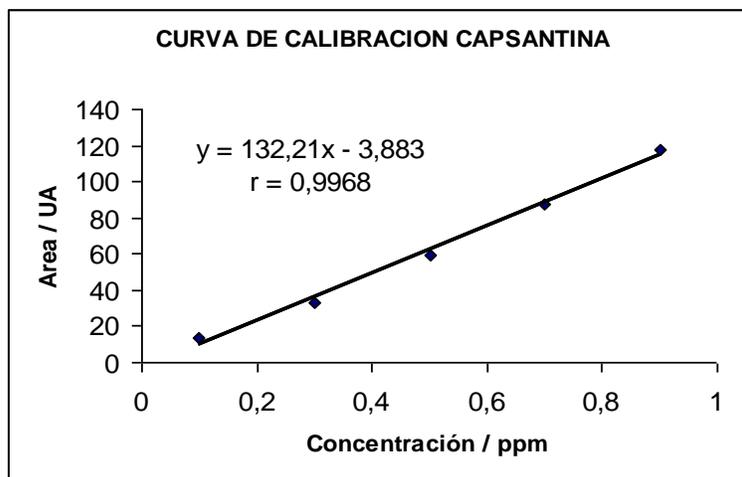


Tabla 13. Concentraciones y áreas de capsantina para la curva de calibración

Concentración (ppm)	0,10	0,30	0,50	0,70	0,90
Área Promedio (mUA)	13,34	32,87	59,03	87,77	118,10

Figura 21. Curva de calibración para la determinación de capsorubina en frutos de ají. Condiciones experimentales: Tabla 12. Concentraciones y áreas: Tabla 14

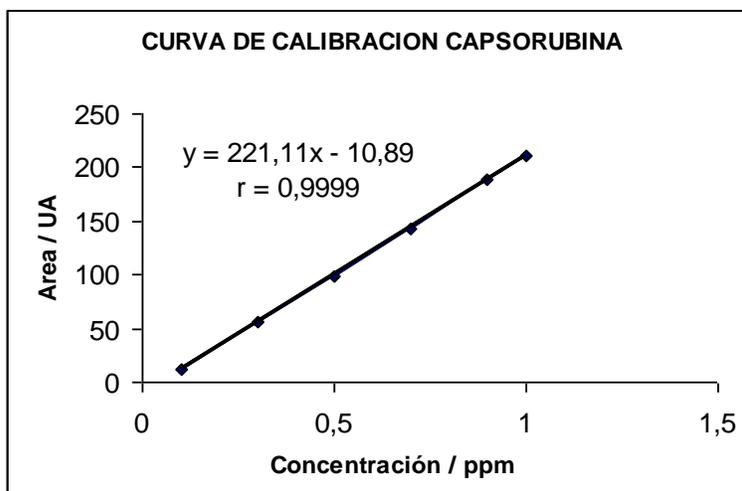


Tabla 14. Concentraciones y áreas de capsorubina para la curva de calibración

Concentración (ppm)	0,10	0,30	0,50	0,70	0,90	1,00
Área Promedio (mUA)	11,77	55,93	98,13	143,53	188,47	210,70

De acuerdo a las curvas anteriores y a los coeficientes de correlación obtenidos (Valores cercanos a 1), se demuestra la respuesta lineal que presenta el área registrada en el análisis cromatográfico con el rango de concentraciones trabajadas. Teniendo en cuenta que el mejor indicador del modelo lineal es el test estadístico con el cual se calculó el valor de t_r siendo mayor en todos los casos al compararlo con el t tabulado para un 95 % de confianza y $n-2$ grados de libertad, indicando una correlación lineal significativa (Tabla 15). Las medidas realizadas de las áreas de cada solución estándar se realizaron por triplicado con el fin de estandarizar el método.

Tabla 15. Test estadístico como indicador de una correlación lineal significativa

Carotenoide	t_{cal}	t_{tabla}^*
Capsantina	68.54	2.14
Capsorubina	47.17	2.10

* Para un 95% de confianza

3.5.2 Precisión

Repetitividad. Para determinar la precisión del método se midió por triplicado el área de cada uno de los puntos de la curva de trabajo para capsantina y capsorubina. Se tuvo en cuenta realizar las mediciones en pequeños intervalos de tiempo y evitando la exposición de cada estándar con la luz debido a la labilidad que presentan los carotenoides. Se calculó la desviación estándar relativa de las áreas obtenidas, con el fin de evaluar la repetitividad.

Tabla 16. Concentraciones del estándar de capsantina y sus respectivas desviaciones estándar en una rango de 0.1 a 0.9 ppm

Concentración (ppm)	Área 1 (mUA)	Área 2 (mUA)	Área 3 (mUA)	Área Promedio (mUA)	s	RSD (%)
0,1	13,43	13,60	13,00	13,34	0,31	2,32
0,3	32,20	32,30	34,10	32,87	1,07	3,25
0,5	58,60	58,90	59,60	59,03	0,51	0,87
0,7	85,20	90,60	87,50	87,77	2,71	3,09
0,9	118,20	119,40	116,70	118,10	1,35	1,14

Tabla 17. Concentraciones del estándar de capsorubina y sus respectivas desviaciones estándar en una rango de 0.1 a 1.0 ppm

Concentración (ppm)	Área 1 (mUA)	Área 2 (mUA)	Área 3 (mUA)	Área Promedio (mUA)	s	RSD (%)
0,1	11,90	11,20	12,00	11,77	1,10	9,36
0,3	55,80	56,0	56,00	55,93	0,12	0,21
0,5	97,80	98,50	98,10	98,13	0,35	0,36
0,7	143,30	143,90	143,40	143,53	0,32	0,22
0,9	186,70	189,90	188,80	188,47	1,63	0,86
1,0	210,40	210,60	211,10	210,70	0,36	0,11

De acuerdo a los resultados obtenidos en las tablas anteriores, se puede observar que los valores de RSD bajo un parámetro de confianza del 95% son bajos, por lo que el método de cuantificación de capsantina y capsorubina por HPLC presento repetitividad.

Reproducibilidad. Para determinar la reproducibilidad del método se utilizó tres soluciones estándar de capsantina y capsorubina de diferente concentración preparadas previamente antes del análisis. Las medidas fueron por triplicado durante 15 días. Se realizó en poco tiempo debido a la variabilidad de las áreas medidas producido por la volatilidad de la acetona, solvente en el cual las soluciones de referencia de 25 ppm fueron preparadas. Además se presento degradación por la susceptibilidad de las xantofilas de degradarse en el solvente, cambiar su composición y generar un cambio en el tiempo de retención y áreas medidas.

Tabla 18. Reproducibilidad de las concentraciones de tres estándares de capsantina en un periodo de 15 días.

Concentración (ppm)	Día1 (mUA)	Día 3 (mUA)	Día 5 (mUA)	Día 10 (mUA)	Día 15 (mUA)	Área promedio (mUA)	s	RSD (%)
0,30	32,34	32,76	33,10	33,16	32,84	32,73	0,38	1,16
0,50	58,14	58,26	59,26	58,55	59,44	58,55	0,61	1,05
0,90	118,10	118,35	117,59	118,01	0,39	118,01	0,39	0,33

Tabla 19. Reproducibilidad de las concentraciones de tres estándares de capsorubina en un periodo de 15 días.

Concentración (ppm)	Día 1 (mUA)	Día 3 (mA)	Día 5 (mUA)	Día 10 (mUA)	Día 15 (mUA)	Área promedio (mUA)	s	RSD (%)
0,30	55,80	56,24	56,01	55,98	56,93	56,02	0,22	0,39
0,50	97,77	98,41	98,26	98,15	98,65	98,15	0,33	0,34
0,90	186,60	189,48	188,96	188,63	189,79	188,35	1,53	0,81

Las tablas anteriores indican que el método cromatográfico es reproducible, ya que la desviación estándar relativa (RSD) presenta valores menores del 1,5 % los cuales son bajos⁴⁸, indicando que los datos obtenidos en el método de cuantificación de los carotenoides mayoritarios es confiable.

3.5.3 Sensibilidad

Limite de detección (LD). Para calcular el LD de capsantina y capsorubina se construyó una curva de calibración adicional para cada carotenoide en un rango de concentraciones entre 0.025 a 0.1 ppm para capsantina y de 0.01 a 0.1 ppm para capsorubina, con el fin de evaluar la sensibilidad del instrumento. Las figuras 22 y 23 representan los resultados obtenidos, las ecuaciones empleadas se encuentran en el anexo II.

Figura 22. Curva de calibración para determinar LD y LC de capsantina en frutos de ají. Condiciones experimentales: Tabla 12. Concentraciones y áreas: Tabla 20.

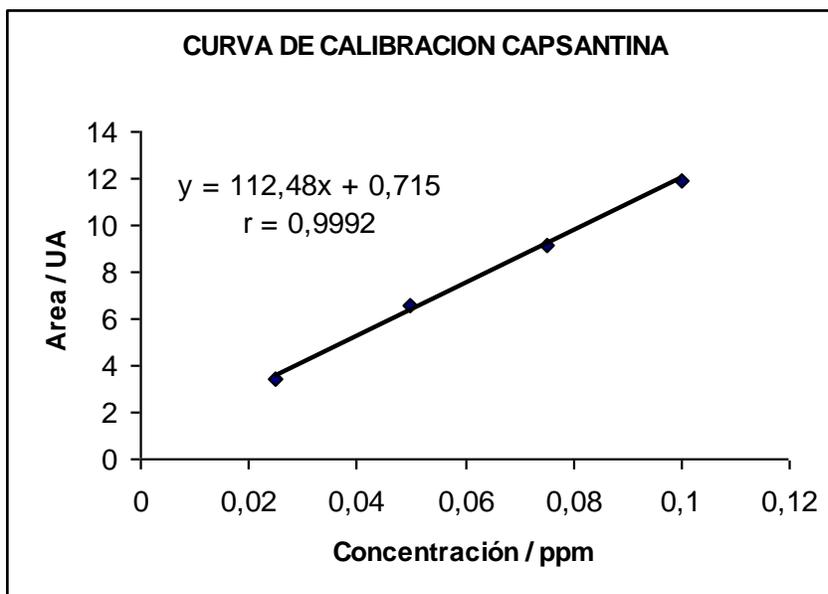


Tabla 20. Concentraciones del estándar de capsantina y sus respectivas áreas en un rango de 0.025 a 0.1 ppm para calcular LD y LC

Concentración (ppm)	Área (mUA)
0,025	3,39
0,05	6,54
0,075	9,16
0,1	11,89

Figura 23. Curva de calibración para determinar LD y LC de capsorubina en frutos de ají. Condiciones experimentales: Tabla 12. Concentraciones y áreas Tabla 21.

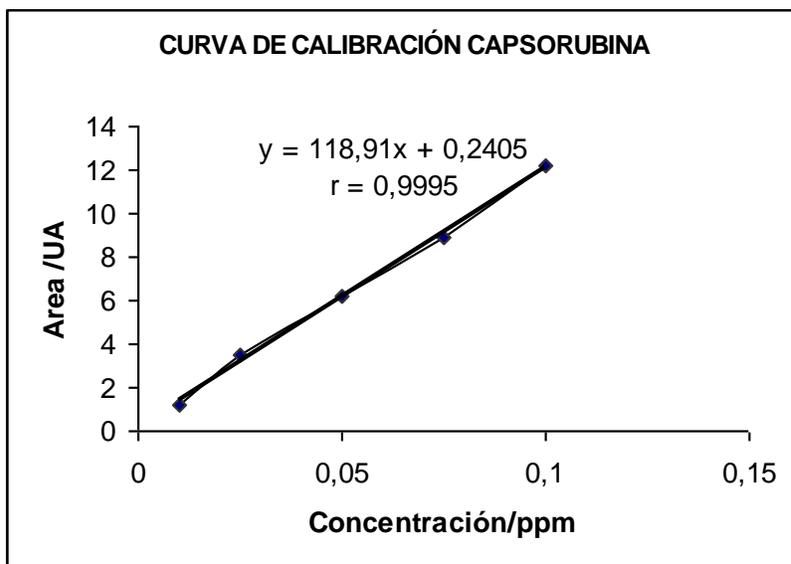


Tabla 21. Concentraciones del estándar de capsantina y sus respectivas áreas en un rango de 0.010 a 0.1 ppm para calcular LD y LC

Concentración (ppm)	Área (mUA)
0,01	1,23
0,025	3,5
0,05	6,24
0,075	8,91

Tabla 22. Límite de detección (LD) para capsantina y capsorubina ⁴⁹

Carotenoide	Desviación estándar de la pendiente S_B	Intercepto Con eje y Y_B	Valor y	Límite de detección LD (ppm)
Capsantina	3,2145	0,7150	10,3584	0,0857
Capsorubina	0,5138	0,8217	2,3630	0,0139

Comparando el límite de detección obtenido (Tabla 22), se encontró que la metodología propuesta es sensible porque se encuentran niveles hasta de 0.01 ppm para determinar este tipo de compuestos por cromatografía líquida de alta resolución.

Límite de cuantificación (LC). A partir de las mismas curvas de capsantina y capsorubina utilizadas para calcular LD y las ecuaciones del anexo II, se procede a determinar el LC, obteniéndose los datos de la tabla 23.

Tabla 23. Límite de cuantificación (LC) para capsantina y capsorubina⁴⁹

Carotenoide	Desviación estándar de la pendiente S_B	Intercepto Con eje y Y_B	Valor y	Límite de detección LD (ppm)
Capsantina	3,2145	0,7150	32,8597	0,2858
Capsorubina	0,5138	0,8217	5,9595	0,0463

De acuerdo a los resultados obtenidos, tanto en la reproducibilidad como en la repetitividad, se obtuvieron RSD menores al 4% para capsantina y capsorubina, que permiten realizar mediciones precisas, lo cual es excelente para la determinación de los carotenoides mayoritarios en frutos de ají. Además con los resultados es posible afirmar que el método de cromatografía líquida de alta resolución ofrece bajos límites de detección, cuantificación y alta sensibilidad para la determinación de carotenoides en muestras vegetales, como el ají.

1.5.4 Exactitud.

Con el fin de establecer la exactitud del método analítico, se realizó el test student con base en los datos obtenidos en las curvas de calibración de capsantina y capsorubina.

Tabla 24. Datos para realizar el t student y calcular el porcentaje de recuperación de estándares de capsantina en una rango de concentraciones de 0.1 a 0.9 ppm

Concentración (ppm)	Recuperación porcentual (R)			R promedio	s	RSD
0,1	102,57	102,12	102,94	102,54	0,41	0,40
0,3	98,3	96,24	98,6	97,71	1,28	1,31
0,5	97,82	100,13	100,35	99,43	1,40	1,41
0,7	97,85	100,02	100,11	99,33	1,28	1,29
0,9	98,68	99,16	100,09	99,31	0,72	0,72
Promedio =				99,67	1,02	1,03
						t_{cal} = 1.26

* t_{tab} = 2.12 para 95%

Tabla 25. Datos para realizar el t student y calcular el porcentaje de recuperación de estándares de capsorubina en una rango de concentraciones de 0.1 a 1.0 ppm

Concentración (ppm)	Recuperación porcentual (R)			R promedio	S	RSD
0,1	96,85	96,84	96,17	96,62	0,39	0,40
0,3	103,85	104,14	104,73	104,24	0,45	0,43
0,5	100,16	101,18	102,53	101,29	1,19	1,17
0,7	96,72	97,98	98,09	97,60	0,76	0,78
0,9	97,82	99,87	101,23	99,64	1,72	1,72
1,0						
Promedio =				99,88	0,90	0,90
						t_{obt} = 0.58

t_{tab} = 2.10 para 95%

La recuperación porcentual (R) promedio total se da como resultado de cada concentración, teniendo en cuenta que cada una fue leída por triplicado, obteniéndose tres resultados que son promediados para dar la concentración obtenida por curva. De esta manera el número de datos es 15 para capsantina y 18 para capsorubina, los grados de libertad son 14 y 17 respectivamente para un 95 % de confianza. Cabe aclarar que R corresponde a la relación de la concentración del estándar preparado.

Para que la exactitud exista es necesario que t_{cal} sea menor que t_{tab} , parámetro que se cumple para capsantina y capsorubina, verificándose de esta manera la exactitud del sistema.

3.5.5 Estimación de la concentración por HPLC de capsantina y capsorubina en muestra de ají

De acuerdo a los parámetros ya establecidos por curva de calibración (pendiente e intercepto) de capsantina y capsorubina, se determinó la concentración de capsantina y capsorubina relacionando el área bajo la curva con las ecuaciones lineales obtenidas en cada una de las curvas de calibración.

Los valores obtenidos de capsantina y capsorubina para la oleoresina de ají habanero y ají tabasco sin semilla deshidratado a temperatura ambiente y extraída mediante metodología soxhlet con acetona están relacionados en la tabla 26, en la figura 24 el respectivo cromatograma. Con respecto a estos datos se puede concluir que la variedad habanero posee mayor cantidad de pigmento (oleoresina) y además de capsantina y capsorubina encontrando mayor cantidad de la primera.

Figura 24. Cromatograma de tres inyecciones consecutivas de muestras de ají bajo las condiciones de la tabla 4: a) variedad habanero y b) variedad tabasco

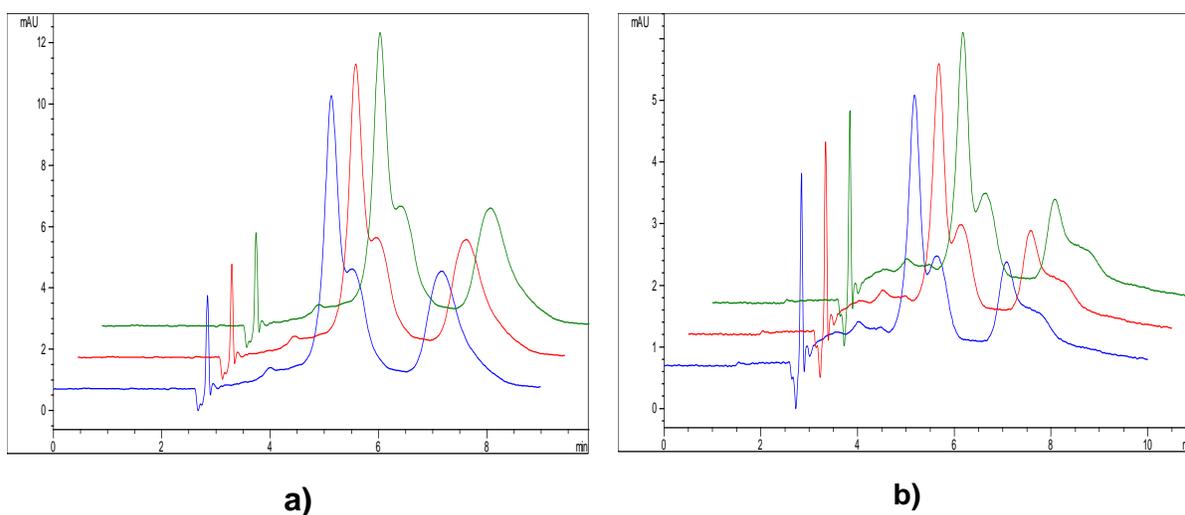
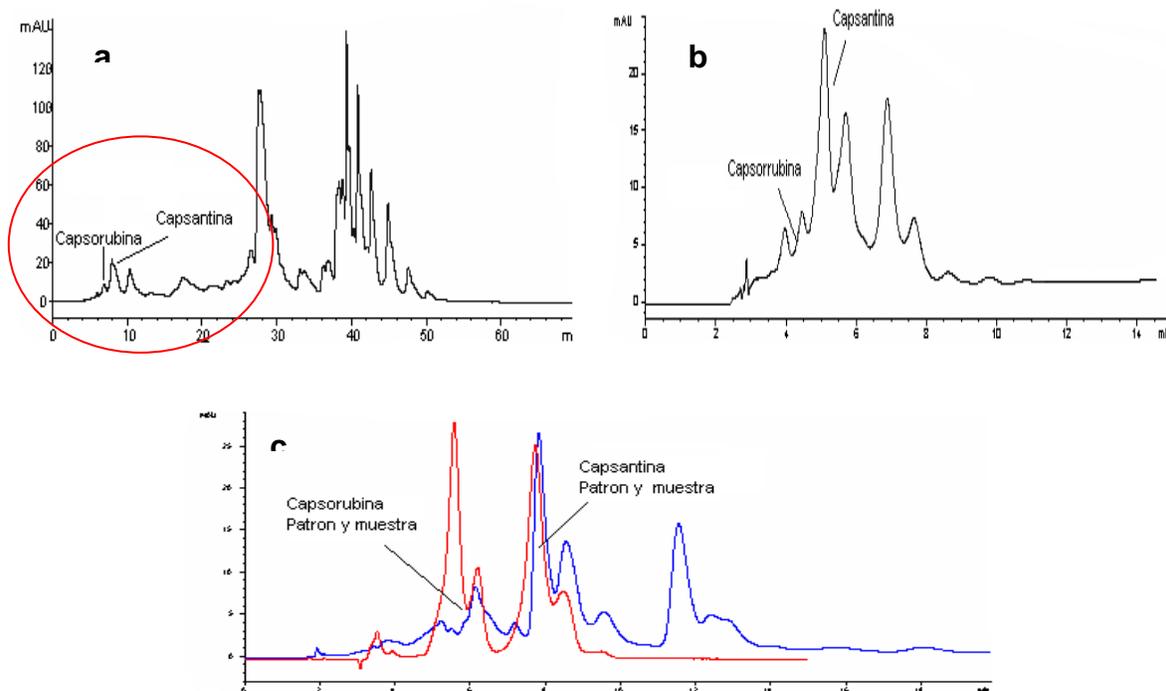


Tabla 26. Cantidad de capsantina y capsorubina en muestras de ají (base seca)

Carotenoide	Replicas	Habanero	Tabasco
		Concentración mg/g muestra	Concentración mg/g muestra
Capsantina	1	0,1032	0,0034
	2	0,1028	0,0033
	3	0,1023	0,0032
	x	0,1028	0,0033
	s	0,0005	0,0001
	RSD (%)	0,4388	3,1734
Capsorubina	1	0,0019	0,0010
	2	0,0020	0,0010
	3	0,0019	0,0009
	x	0,0019	0,0010
	s	0,0001	0,0000
	RSD (%)	3,3197	3,0348

Figura 25. Cromatogramas de capsantina y capsorubina en (a) Extracto no saponificado (b) Extracto saponificado y ampliado (c) Comparación de la muestra (pigmento extraído) y el patrón



Reportes acerca de las variedades tabasco y habanero⁵⁰ muestran contenidos de capsantina de 14,64 mg/100 g y 0.675 mg/100g, valores que difieren con respecto a los encontrados en esta investigación, lo cual se puede justificar debido a que las concentración de estos carotenoides dependen de las condiciones climáticas, el cultivo, el estado de maduración en el que se encuentre el fruto en el momento del estudio y las condiciones experimentales de manipulación de los extractos que contiene estos carotenoides.

Con la metodología empleada para la extracción de los carotenoides mayoritarios, se obtuvieron porcentajes de recuperación de 92,21 y 91,83 % para capsantina y capsorubina respectivamente, esto indica que el método empleado es conveniente para la determinación de este tipo de analito en matrices complejas como lo son los frutos de ají. Las tablas 27 y 28, muestran los porcentajes de recuperación obtenidos para capsantina y capsorubina. De acuerdo a estos datos en donde se obtienen RSD menores del 2 % determinan la precisión del método empleado.

Tabla 27. Porcentajes de recuperación de una solución de capsantina de 0.5 ppm en muestras de ají

% RECUPERACIÓN			R promedio	s	RSD (%)
92,58	91,15	92,16	91,96	0,73	0,80
91,26	93,54	93,04	92,61	1,20	1,29
92,45	92,86	90,11	91,81	1,48	1,62
91,15	92,73	92,36	92,08	0,83	0,90
Promedio			92,12	1,06	1,15

Tabla 28. Porcentajes de recuperación de una solución de capsorubina de 0.5 ppm en muestras de ají

% RECUPERACIÓN			R promedio	s	RSD (%)
92,15	92,87	90,15	91,72	1,41	1,54
93,12	91,44	92,75	92,44	0,88	0,95
91,03	92,10	90,56	91,23	0,79	0,87
90,25	91,56	92,36	91,39	1,06	1,17
Promedio			91,70	1,04	1,13

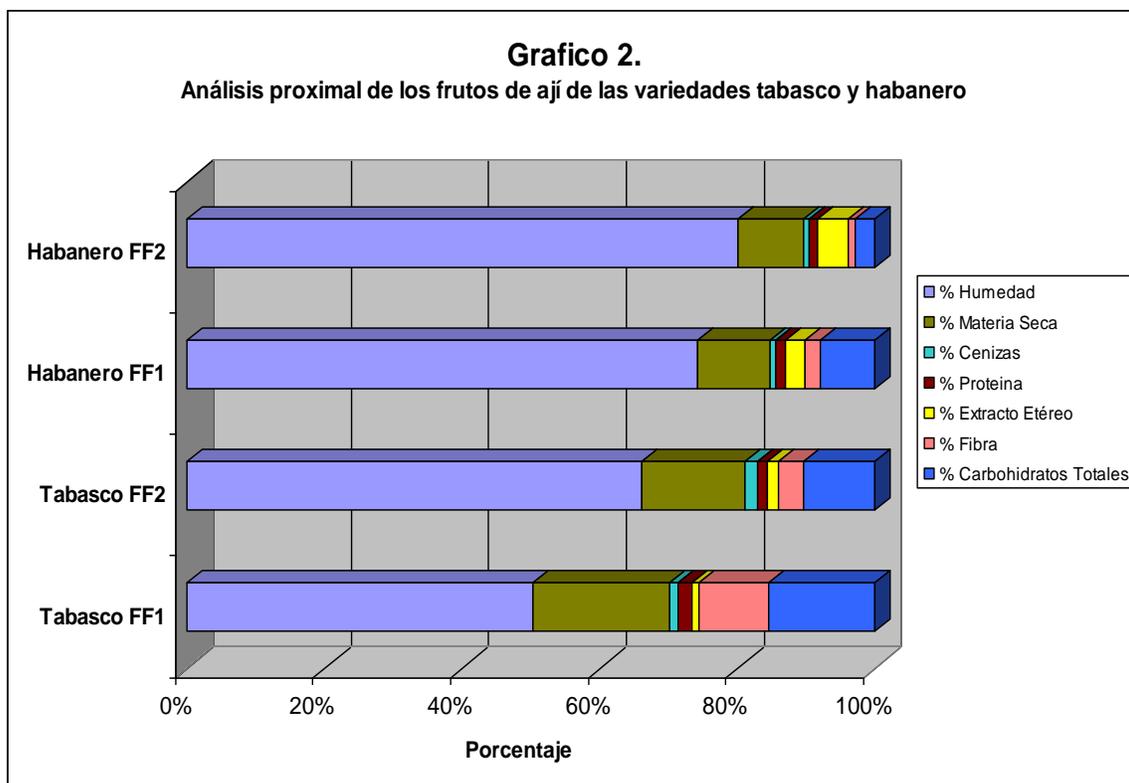
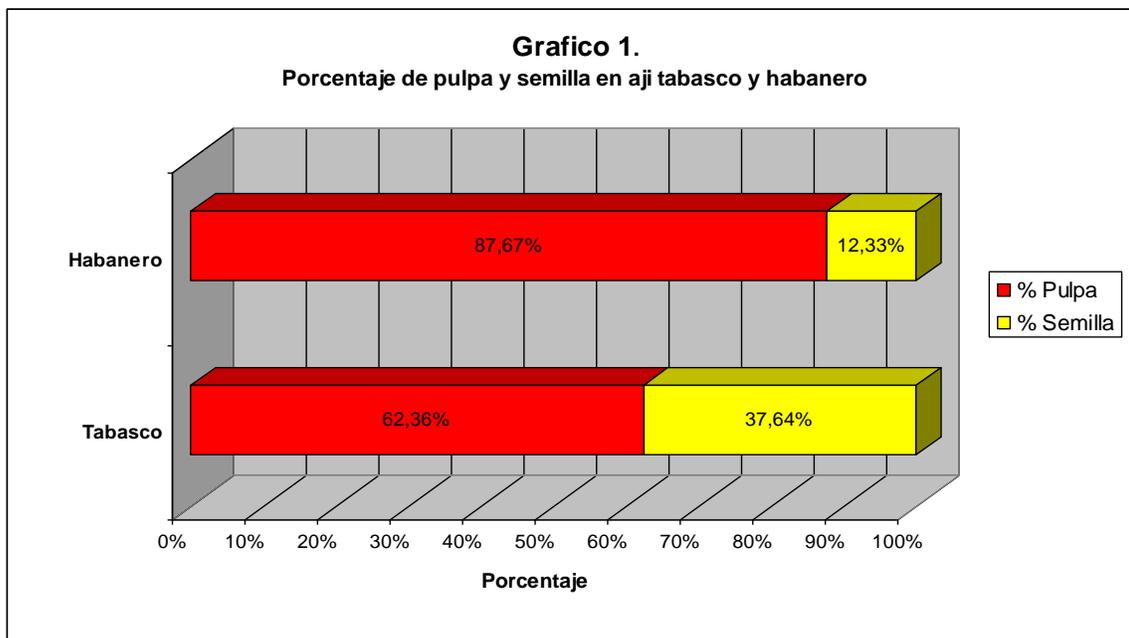
4. CONCLUSIONES

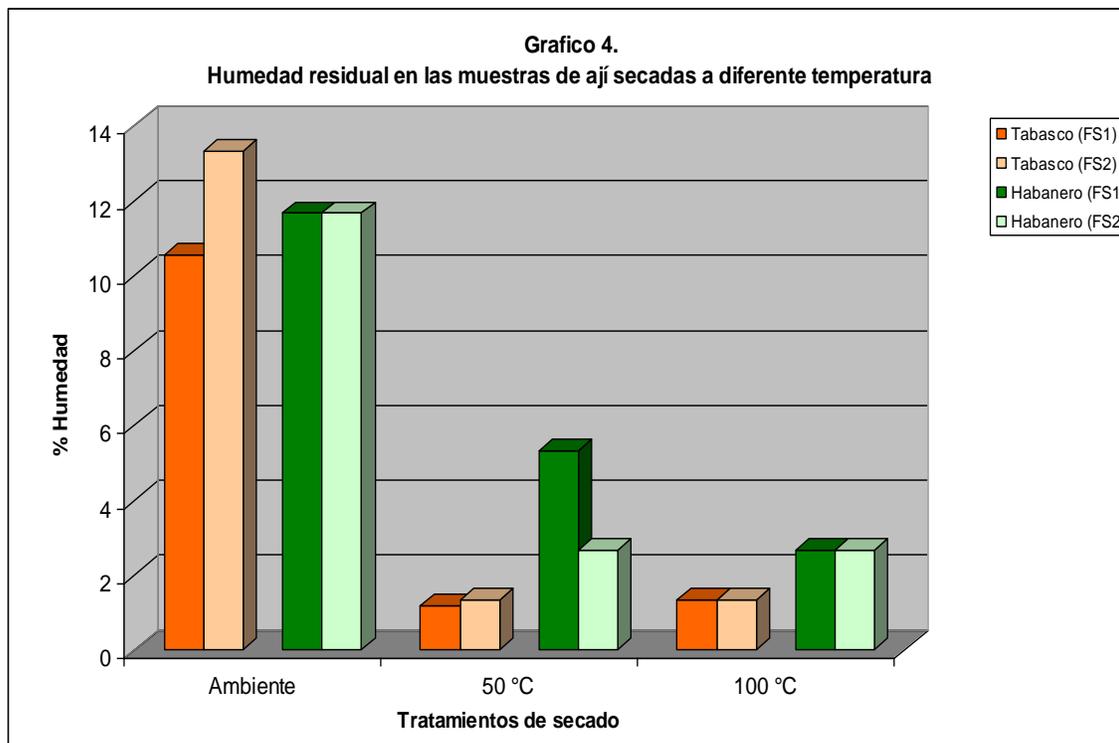
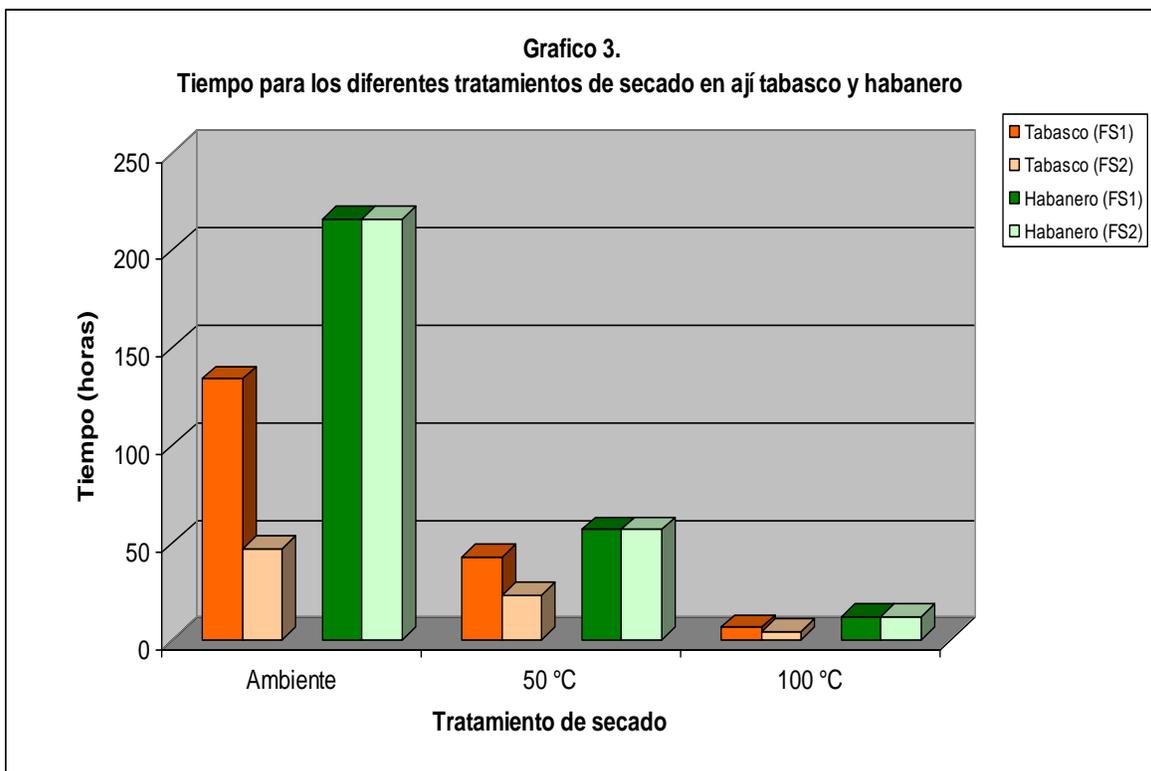
- El porcentaje de pigmento extraído fue alto, empleando como metodología de extracción soxhlet usando etanol como solvente. Sin embargo la evaluación por HPLC demostró que la acetona es más eficiente en la extracción de capsantina y capsorubina, especialmente de muestras deshidratadas a temperatura ambiente y sin semillas. La variedad habanero presentó mayores porcentajes de pigmento extraído, así como de los carotenoides capsantina y capsorubina.
- La evaluación preliminar de la estabilidad del pigmento extraído con respecto a la luz y temperatura permitió visualizar la degradación proporcional del colorante por factores de luz U.v y temperatura. Por su parte la acidez se mantuvo constante potenciando el uso del pigmento en materias primas o procesos donde existan cambios de pH.
- Las cantidades de capsantina y capsorubina determinadas en frutos de ají fueron proporcionales a la cantidad de pulpa presente en cada una de las variedades en estudio, obteniéndose casi tres veces mayor contenido de estos en la variedad Habanero con respecto a la variedad Tabasco.
- El método de cromatografía líquida de alta resolución demostró ser una técnica útil para la determinación de los carotenoides mayoritarios del fruto del ají, debido a que en la optimización de las diferentes variables cromatográficas se obtuvieron excelentes parámetros analíticos como: linealidad en el rango de trabajo, precisión del instrumento, exactitud y sensibilidad del método, suministrando resultados satisfactorios.

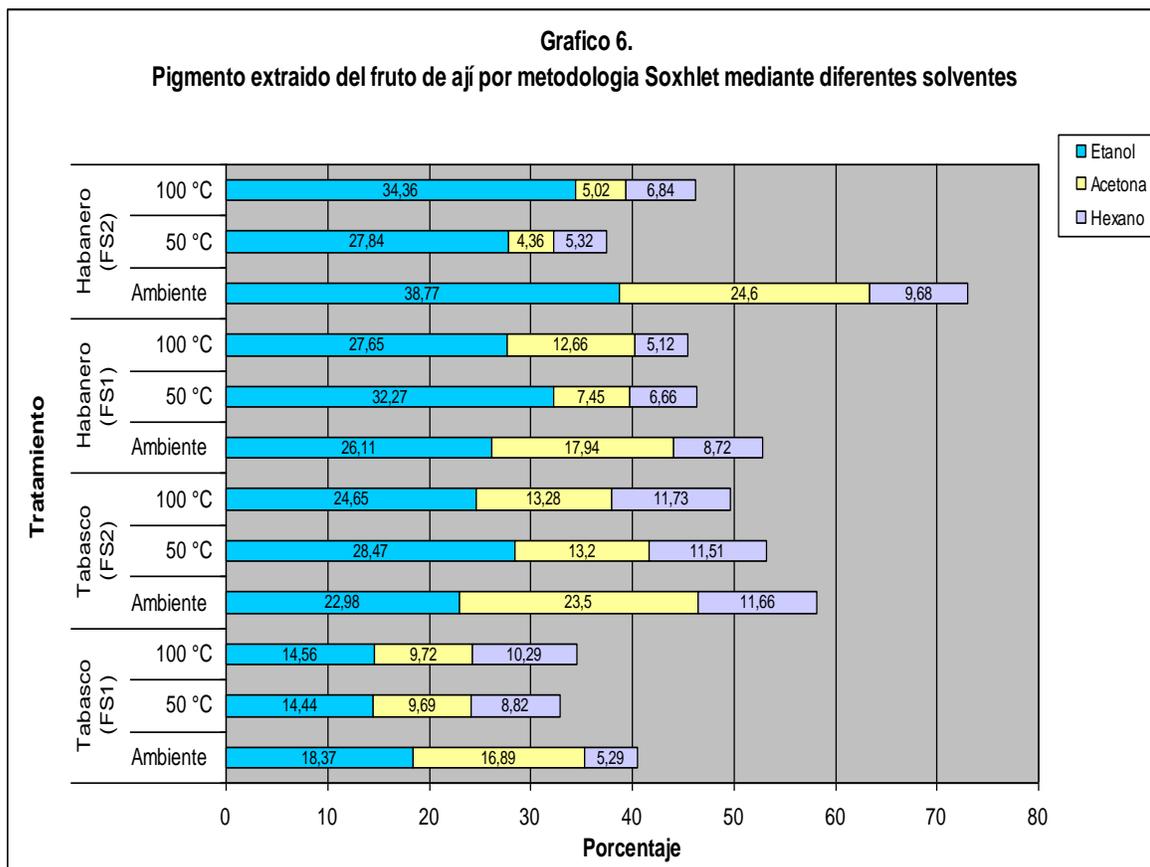
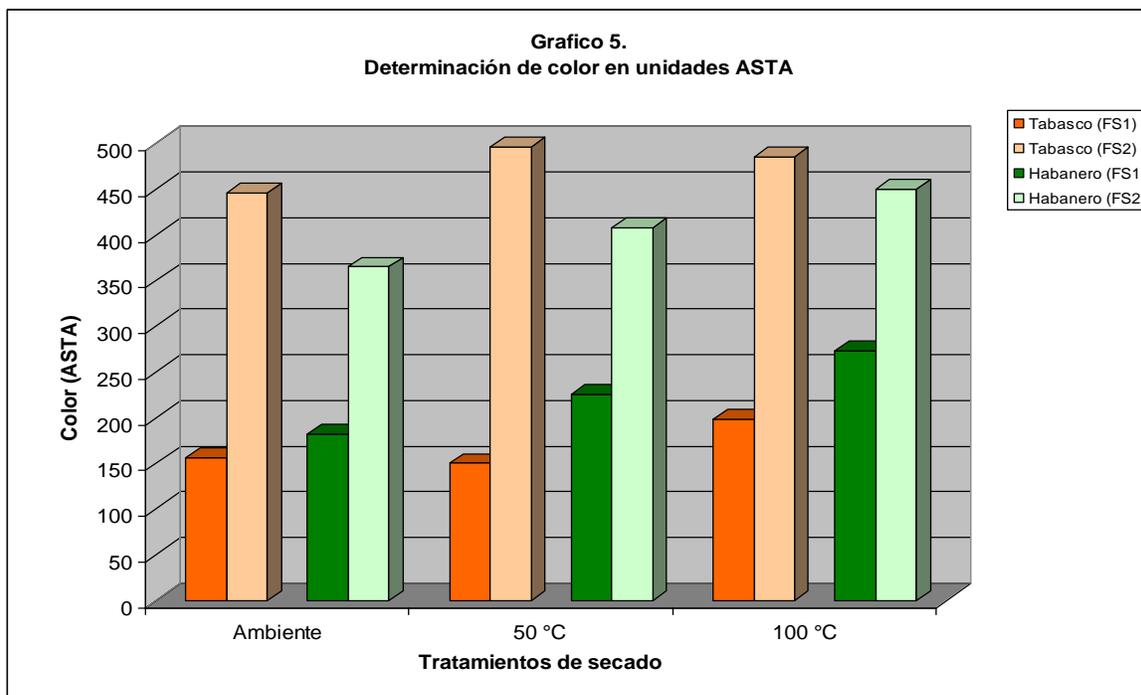
- Se desarrolló una metodología óptima, y reproducible para la obtención y cuantificación de los pigmentos mayoritarios del ají, especie de la cual no se han elaborado estudios relacionados con el aprovechamiento de sus pigmentos en el departamento del Cauca.
- El método de cuantificación por HPLC permitió alcanzar límites de detección y límites de cuantificación bastante bajos comparados con los reportados en otros estudios por la misma técnica, demostrando la alta sensibilidad que se puede lograr en análisis cuantitativos de matrices complejas como lo son los frutos de ají.
- Con los resultados obtenidos en esta investigación se propone abrir la posibilidad de emplear parte de estos productos en diferentes campos industriales ya sea agrícola, de alimentos, de productos químicos o textil, proyectando de esta forma el fruto del ají como una fuente prometedora de productos que pueden ser viablemente aprovechables en el departamento del Cauca, como también a nivel nacional.

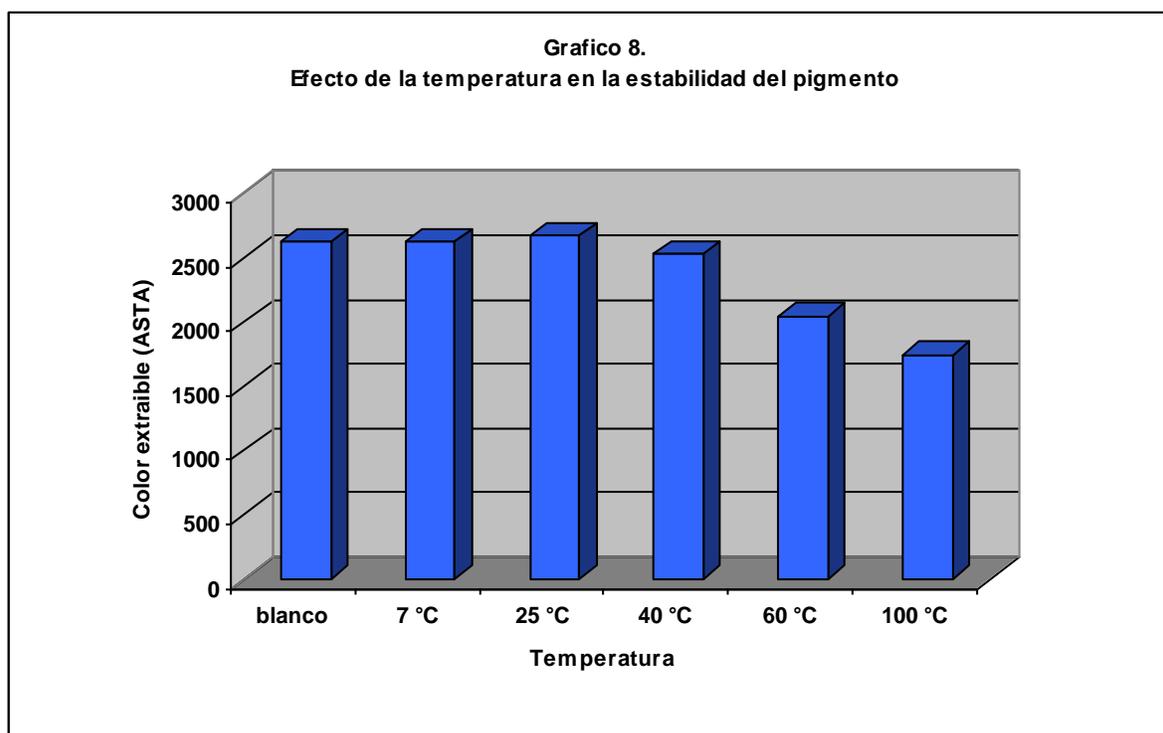
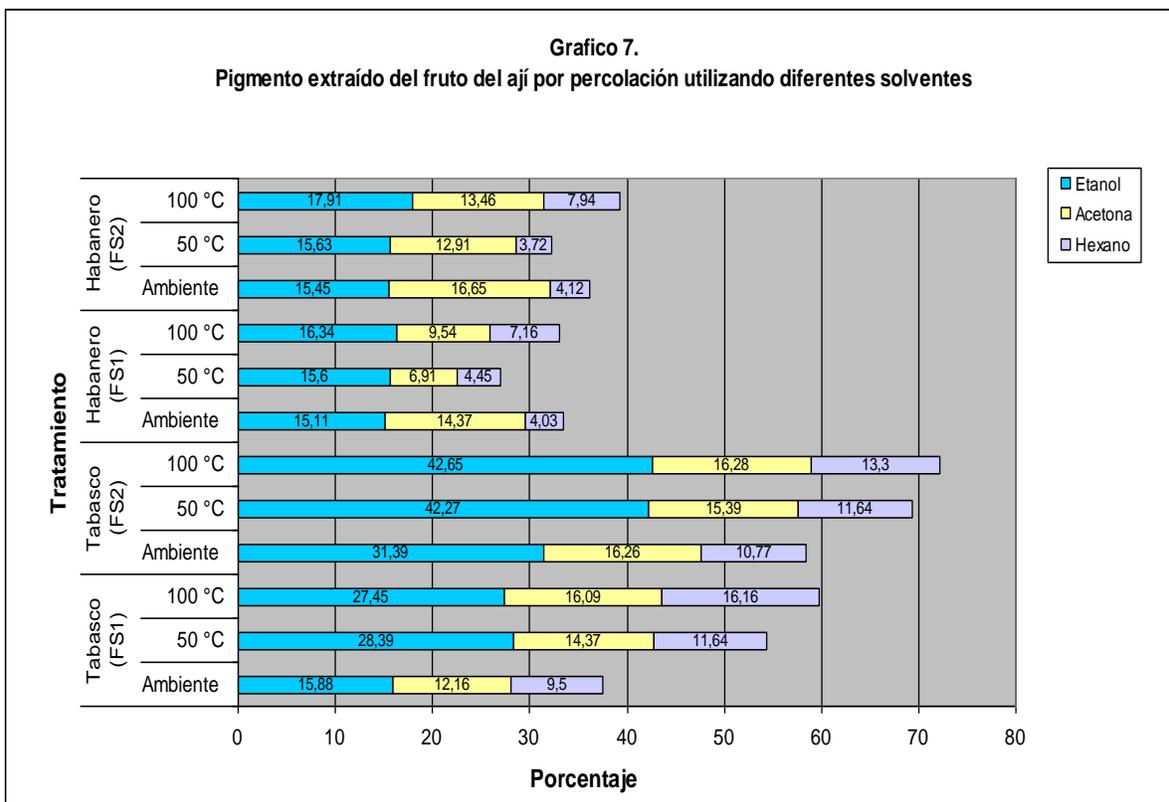
6. ANEXOS

ANEXO I









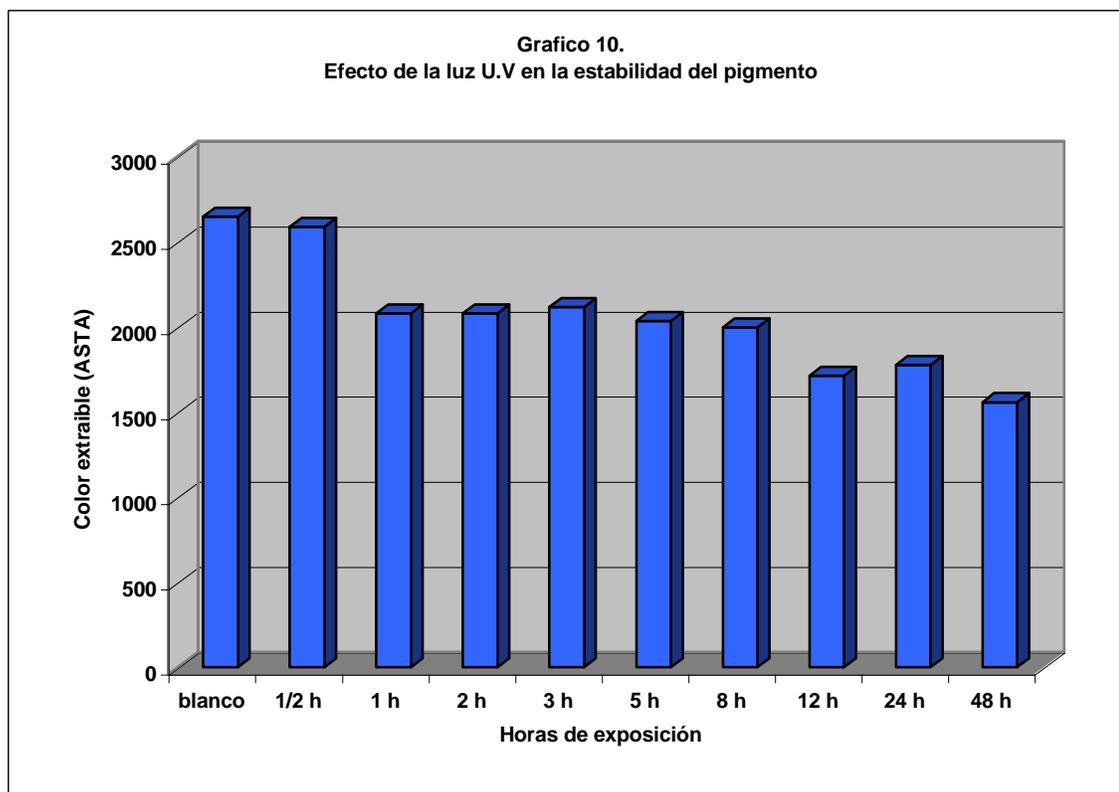
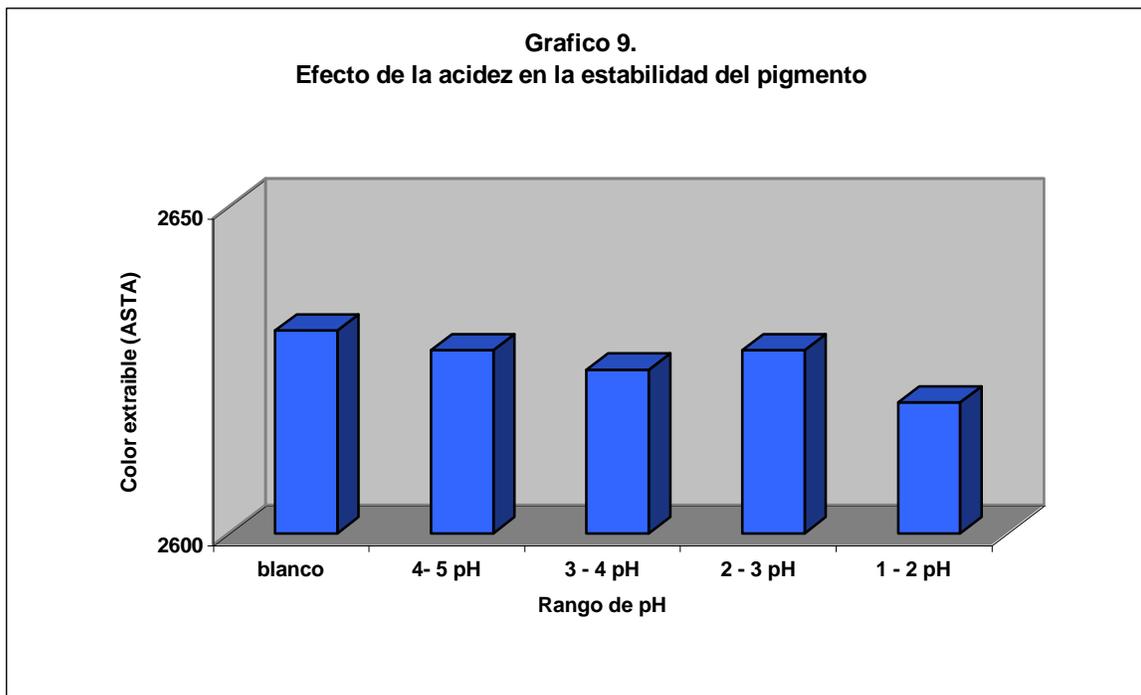
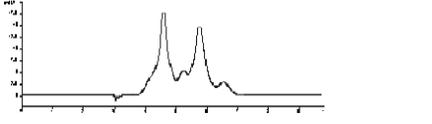
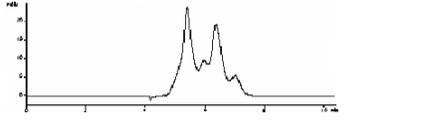
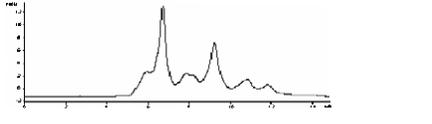
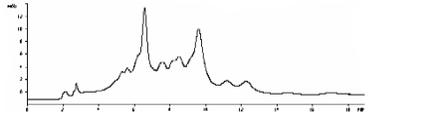
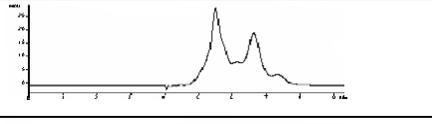
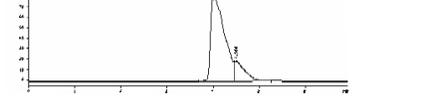
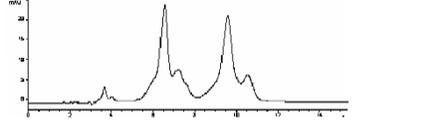
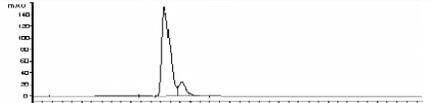
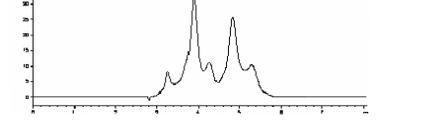


Tabla 29. Evaluación de eluentes para la estandarización de la fase móvil para el análisis por HPLC

Eluentes	Características cromatográficas de los picos	Cromatograma
AE: ACN: EtOH	Baja resolución Picos anchos y poco definidos	
AE: ACN: MeOH	Baja resolución Picos anchos y poco definidos	
ACN: MeOH: Agua	Baja resolución Descomposición Picos anchos y poco definidos	
Acetona: Agua: MeOH	Baja resolución Descomposición Picos anchos y poco definidos	
AE: ACN: ISOP	Baja resolución Baja intensidad	
Acetona: Agua: ISOP	Resolución nula	
AE: ACN: MeOH 80%	Buena resolución Mayor definición.	
AE: THF: MeOH 75%	Resolución nula	
AE: ACN:THF: MeOH 75%	Buena resolución, Buena definición Mayor intensidad	

AE: acetato de etilo, ACN: acetonitrilo, EtOH: etanol, MeOH: metanol, ISOP: isopropanol, THF: tetrahidrofurano

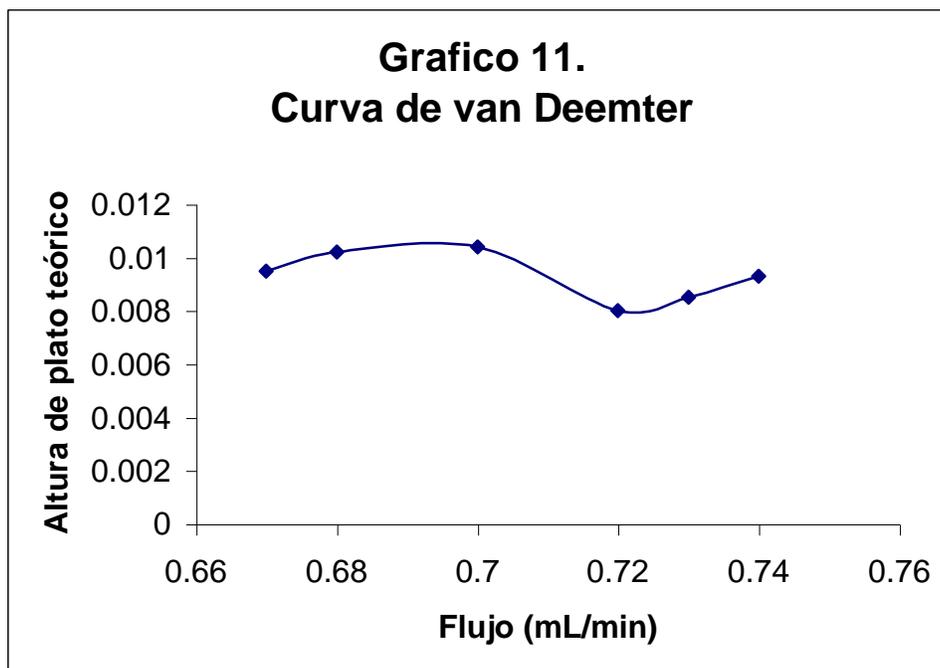


Tabla 30. Altura de plato teórico y flujo para la curva de van Deemter

Flujo (mL/min)	H (mm)
0,67	0,0095
0,68	0,0102
0,7	0,0104
0,72	0,008
0,73	0,0085
0,74	0,0093

ANEXO II

Una vez se ha implementado la técnica cromatográfica y el método de análisis, se requiere la conformación de los resultados obtenidos para observar que cumplan con las especificaciones requeridas.

LINEALIDAD

Para poder determinar la linealidad (dentro de un rango específico), se elaboraron una serie de seis disoluciones a partir del estándar de referencia, con el fin de analizar cada una por triplicado en el cromatógrafo, y así, obtener la curva por regresión lineal, la cual tiene la siguiente fórmula matemática:

$$y = bx + a \quad (1)$$

Donde **b** es la pendiente de **a** es el intercepto con el eje **y**. De ésta manera se obtiene un coeficiente de correlación (**r**), el cual determina la linealidad de dicha curva.

El análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados proporciona la ecuación para la mejor recta a través de un conjunto de pares de datos **x**, **y**, cuando existe una relación lineal entre las dos variables y los datos en **x** contienen un mínimo de incertidumbre.

PRECISIÓN

La precisión una medida de la concordancia de los resultados con los de otros obtenidos exactamente en la misma forma. Este término se utiliza para describir qué tan reproducible son las mediciones; es decir que tan semejantes son los resultados que se han obtenido exactamente de la misma forma. Por lo general, la precisión de una medición se puede determinar simplemente repitiendo la medición en proporciones semejantes de la muestra. Para describir la precisión de un conjunto

de datos repetidos se utilizan tres términos muy conocidos: la desviación estándar y la desviación estándar relativa.

Media de la muestra: \bar{X}

Es el valor promedio de una muestra limitada obtenida de una población de datos y se define por la ecuación:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad (2)$$

Desviación estándar: S

La desviación estándar es una medida de la precisión o dispersión de una población de datos, y está dada por la ecuación:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n X_i (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}} \quad (3)$$

Desviación estándar relativa: RSD

Es el porcentaje de la desviación estándar y se calcula así:

$$RSD = \frac{(s \times 100)}{\bar{X}} \quad (4)$$

EXACTITUD

El término exactitud indica qué cerca está una medición de su valor verdadero o aceptado, y se expresa como error. Para determinarla se utiliza el t de student:

$$t_{cal} = |100 - R| \sqrt{n} / RSD \quad (5)$$

Donde **R** es la recuperación porcentual y t_{cal} es el valor de **t** obtenido experimentalmente.

El t_{cal} es comparado con el valor t_{tab} (valor de t tabulado para n-1 grado de libertad); si t_{cal} es menor que t_{tab} , no existe diferencia significativa con el 100% de recuperación, y de esta forma, la exactitud es aprobada.

SENSIBILIDAD

La sensibilidad de un instrumento o de un método mide su capacidad de discriminar entre pequeñas diferencias en la concentración de analito, para lo cual se tiene que los parámetros para evaluar la sensibilidad del método son los límites de detención y cuantificación.

Límite de detención: (LOD)

Es la concentración o peso mínimo de analito que puede detectarse para un nivel de confianza dado, proporcionando una señal significativa diferente de la “señal de fondo”, lo cual se expresa matemáticamente como:

$$y = y_B + 3S_B \quad (6)$$

Donde **y** es la señal analítica, y_B es la señal media del blanco (abcisa igual a cero) y S_B es la desviación estándar del mismo.

Sustituyendo y en la ecuación (1) y reordenando, se obtiene finalmente la expresión adecuada para calcular la concentración del límite de detección.

Límite de cuantificación: (LOQ)

Es la concentración o peso mínimo de analito más pequeño con la que pueden realizarse medidas cuantitativas, en donde las medidas cuantitativas, generalmente se toman cuando éste (LOQ) es igual a diez veces la desviación estándar del blanco. Análogamente al LOD se tiene:

$$y = y_B + 10S_B \quad (7)$$

COMPARACIÓN DE LAS MEDIAS DE DOS MUESTRAS

Una forma por la que los resultados de un método analítico nuevo pueden comprobarse es por comparación de los obtenidos empleando un segundo método. En este caso se tienen dos medias muestrales, si las dos muestras no tienen desviaciones estándar significativamente diferentes, se emplea la siguiente fórmula:

$$s^2 = \{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2\} / (n_1 + n_2 - 2) \quad (8)$$

Se demuestra entonces que t está dado por:

$$t = (\bar{x}_1 - \bar{x}_2) / s \sqrt{(1/n_1 + 1/n_2)} \quad (9)$$

donde t tiene $n_1 + n_2 - 2$ grados de libertad.

Si las dos muestras presentan desviaciones estándar significativamente diferentes, se emplea la siguiente fórmula:

$$t = (x_1 - x_2) / \sqrt{(s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2)}$$

(10)

LA PRUEBA F PARA LA COMPARACIÓN DE DESVIACIONES ESTÁNDAR

La prueba F compara las desviaciones estándar de dos conjuntos de datos, y se define por la siguiente ecuación:

$$F = s_1^2 / s_2^2 \quad (11)$$

donde s_1^2 y s_2^2 son las desviaciones estándar de dos grupos de datos.

ANEXO III

Tabla 31. Comparación de la medias muestrales de las metodologías soxhlet y percolación para capsantina en la variedad habanero

Replicas	METODOLOGÍAS mg/100 g	
	Soxhlet	Percolación
1	10,22	4,13
2	10,48	3,97
3	10,8	4,42
4	10,32	3,94
5	10,26	4,10
6	10,34	3,98
x =	10,40	4,09
s =	0,21	0,18
s* =	0,20	
F =	0,05	
t =	55,52	

Tabla 32. Comparación de la medias muestrales de las metodologías soxhlet y percolación para capsorubina en la variedad habanero

Replicas	METODOLOGÍAS mg/100 g	
	Soxhlet	Percolación
1	1,91	0,69
2	2,01	0,64
3	1,85	0,59
4	1,89	0,54
5	1,96	0,48
6	2,00	0,62
x =	1,94	0,59
s =	0,06	0,07
s* =	0,07	
F =	0,85	
t =	33,49	

Tabla 33. Comparación de la medias muestrales de las metodologías soxhlet y percolación para capsantina en la variedad tabasco

Replicas	METODOLOGÍAS mg/100 g	
	Soxhlet	Percolación
1	3,42	1,67
2	3,33	1,75
3	3,21	1,61
4	3,3	1,72
5	3,21	1,68
6	3,29	1,62
x =	3,29	1,68
s =	0,08	0,05
s* =	0,07	
F =	1,45	
t =	29,13	

Tabla 34. Comparación de la medias muestrales de las metodologías soxhlet y percolación para capsorubina en la variedad tabasco

Replicas	METODOLOGÍAS mg/100 g	
	Soxhlet	Percolación
1	1	0,42
2	1,04	0,51
3	0,98	0,48
4	1,12	0,53
5	1,08	0,46
6	0,99	0,51
x =	1,04	0,49
s =	0,06	0,04
s* =	0,05	
F =	1,38	
t =	13,84	

5. BIBLIOGRAFIA

- ¹ MÍNGUEZ, M., JARÉN M. y GARRIDO J. Effect of Processing of Paprika on the Main Carotenes and Esterified Xanthophylls present in the Fresh Fruit. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 41, (1993); p. 2120 – 2124
- ² JARE´N, G, et al. Paprika (*Capsicum annum*) Oleoresin Extraction with Supercritical Carbon Dioxide. En: *Journal Agric. Food Chemical*. Vol 47,(1999); p. 3558-3564
- ³ Rocabado F. Análisis de la cadena de valor agro-alimentaría del ají: Fundación Para El Desarrollo De Tecnología Agropecuarias Valles: Cochabamba, Bolivia. 2001. [Citado en Septiembre de 2001]. Disponible en Internet: <<http://www.fdtavalles.org/Pages/Publica.html>>
- ⁴ ENCLOPEDIA TERRANOVA: Producción agrícola. Bogotá: Terranova, 1995. v.2, p. 406 – 407.
- ⁵ SKOOG D., HOLLER F., NIEMAN T. Principios de Análisis Instrumental. Editorial Mc Graw Hill. Quinta Edición. España. 2001. p. 731-754,793
- ⁶ DELI, J, et al. Separation and identification of carotenoids from different coloured paprika (*capsicum annum*) by reversed-phase high-performance liquid chromatography. En: *Eur Food Res Technol*. Vol 213. (2001); p. 301-305
- ⁷ WEISSENBERG M, et al. Isocratic non-aqueous reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of capsanthin and capsorubin en red peppers (*Capsicum annum* L.), paprika and oleoresin. En: *Journal of chromatography A*. Vol.757. (1997); p. 89-95

- ⁸ FEDERACIÓN NACIONAL DE CAFETEROS. El cultivo del Pimentón. 7 ed. Bogotá: Linotipia Bolívar, 1994. p. 3 – 5.
- ⁹ COLONIA Carlos E. El Cultivo del ají Cayenne (*Capsicum annum*), una alternativa para agricultores del Valle del Cauca. En: *Cultivo* (1999); p.13-24
- ¹⁰ RODRIGUEZ D.B., Carotenoides y preparación de Alimentos: La Retención de los carotenoides Provitamina A en Alimentos Preparados, Procesados y Almacenados. Universidad estadual de Campinas. Brasil. 1999. p. 7 – 13.
- ¹¹ MÍNGUEZ, M. et al. Carotenoid content of the varieties Jaranda and Jariza (*Capsicum annum* L.) and response during the industrial slow drying and grinding steps in Paprika processing. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 48, (2000); p. 2972 – 2976
- ¹² KIM S., PARK J., y HWANG I.K. Composition of Main Carotenoids in Korean Red Pepper (*Capsicum annum*, L.) and Changes of pigment stability during the drying and Storage Process. En: *Journal of Food Science*. Vol. 69, (2004); p.39 – 44.
- ¹³ HEAN R. Natural Products a Laboratory Guide. United States: Second Edition, 1991. p.105 – 126.
- ¹⁴ RODRIGUEZ-AMAYA D., *et al.* HarvestPlus Handbook for Carotenoid Análisis. Brasil, 2004., 6 p. Universidad Estadual de Campinas. Facultad de Ingeniería de Alimentos. Departamento de Ciencias de Alimentos.
- ¹⁵ OCHOA, N y RAMIREZ R. Invited Review: In Vitro chili Pepper Biotechnology. En: *In vitro Cell. Dev. Biol – Plant*. Vol. 37,(2001); p. 701 – 729.

- ¹⁶ GORDON, M. et al. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. En: *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 430, (2004); p. 37–48 39.
- ¹⁷ RECUEIL DE LEGISLATION. MEMORIAL Journal Officiel du Grand-Duché de Luxembourg. MEMORIAL Amtsblatt des Großherzogtums Luxemburg. Colorants Dans Les Denrees Alimentaire: Marzo 1997. No 20. [Cita Abril1997]. Disponible en Internet: <URL: <http://www.memorialjournalofficiel.luxembourg.html>>
- ¹⁸ FENNEMA O. R. Química de los Alimentos. España: Editorial Acribia, 1993. p. 1095
- ¹⁹ KRINSKY, N. I. 1989. Antioxidant functions of carotenoids. En: *Free Radical Biology. Medicine*. Vol 7:(1990); p.617-635.
- ²⁰ BENDICH, A. and J. A. Olson. 1989. Biological actions of carotenoids. En: *FASEB Journal*. Vol 3 (1992); p. 197-1932.
- ²¹ MATHEWS-ROTH, M. Carotenoid and cancer prevention.experimental and epidemiological studies. En: *Pure Application. Chemistry*. Vol.57, (1985)717-722.
- ²² TAPIERO H., et al. The role of Carotenoids in the prevention of human pathologies. En: *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Vol 58, (2004); p. 100-110.
- ²³ KLINGER W., PINZON C., PACHON M., ROJAS L., y ARAGON J.C. Estudio de las especies promisorias productoras de colorantes en el trópico amazónico: Programa nacional de transferencia de tecnología agropecuaria. Bogota, (2000). p.29-37

- ²⁴ MÍNGUEZ M.I. y HORNERO D. Separation y Quantification of the Carotenoid Pigments in Red Peppers (*Capsicum annuum*), Paprika, and Oleoresin by Reserved-Phase HPLC. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 41, (1993); p.1616-1620
- ²⁵ Britton, G., *et al.* "Carotenoids and Colour in Fruit and Vegetables", En: *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*, 1997, p. 11-27.
- ²⁶ Li, H-B., *et al.*, *Journal of Chromatography A*, Vol. 905. (2001); p. 151-155
- ²⁷ GATTI, R., *et al.*, *Journal of Chromatography A*, Vol. 905. (2001); p. 345-350
- ²⁸ RODRIGUEZ-AMAYA D., and KIMURA M. HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis. En: *HarvestPlus Technical Monograph 2*. (2004).p.2-25
- ²⁹ OLIVER J. and PALOU A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. En: *Journal of Chromatography A*. Vol. 881, (2000); p.543-555
- ³⁰ ADEWSUSI, S. and BRADBURY J. Carotenoids in cassava: Comparison of open-column and HPLC methods of analysis. En: *Journal Science Food Agricultural*. Vol 62: (1993). p.375-383.
- ³¹ CARVALHO, P. COLLINS, R. and RODRIGUEZ-AMAYA D.. Comparison of provitamin A determination by normal-phase gravity-flow column chromatography and reversed-phase high performance liquid chromatography. En: *Chromatography A*. Vol. 33 :(1992). p.133-137.
- ³² WILBERG, V. and RODRIGUEZ-AMAYA D. HPLC quantitation of major carotenoids of fresh and processed guava, mango and papaya. En: *Lebensm. Wiss. Technol*. Vol. 28 (1995). p.474-480.

- ³³ KHACHLIK F., SPANGLER c., CANFIELD L., STECK A. and PFANDER H. Analytical Chemistry. Vol. 69, (1997); p.1893.
- ³⁴ QUATTROCCHI O., ABELAIRA S.I., LABA R. Introducción a la HPLC: Aplicación y Práctica. Argentina: Editorial Artes Graficas Farro S.A. 1992. p. 106-109, 242-265.
- ³⁵ GOMÉZ R., *et al.* Evolution of Color during the Ripening of Selected Varieties os Páprika Pepper (*Capsicum annuum L.*) En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 44, (1996); p. 2049 – 2062
- ³⁶ FEDERACIÓN NACIONAL DE CAFETEROS. El cultivo del Pimentón. 7 ed. Bogotá: Linotipia Bolívar, 1994. p. 3 – 5.
- ³⁷ OSBORNE D., y VOOGT P. Análisis de los nutrientes de los alimentos. Editorial ACRIBIA, S.A. España. 1986. p. 113 – 114.
- ³⁸ MORAIS, Helena, *et al.* Effects of fluorescent light and vacuum packaging on the rate of decomposition of pigments in paprika (*capsicum annuumm*) powder determind by reversed-phase high-performance liquid chromatography. En: *Journal of Chromatography A*. Vol.936. (2001); p. 139 –144.
- ³⁹ GALVEZ a., *et al.* Impact of the increased thermal processing on retinol equivalent values of paprika oleoresins. En: *Journal of food engineering*. Vol 71 (2005); p. 379-385.
- ⁴⁰ WEISSENBERG M., *et al.* Isocratic non aqueous reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of capsanthin and capsorubin in red peppers

- (*Capsicum annuum* L.), paprika and oleoresin. En: *Journal of chromatography A*. Vol 757: (1997); p. 89-95
- ⁴¹ HARRIS D. Análisis químico cuantitativo. México: Grupo editorial Iberoamericano, S.A. de CV. 1992. p. 474-475
- ⁴² IUPAC, Analytical Chemistry Division (1978). *Spectrochim Acta* 33B: p. 241-245.
- ⁴³ SOLARTE C. Extracción y cuantificación de capsaicina del fruto del ají (*Capsicum frutescens*) por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y síntesis de análogos o-glicósidos. Popayán, 2004., p. 97. Trabajo de grado (Química). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y de la Educación. Departamento de Química.
- ⁴⁴ VICENTE A., *et al.* UV-C treatments reduce decay, retain quality and alleviate chilling injury in pepper. En: *Postharvest Biology and Technology*. Vol 35, (2005); p.69-78
- ⁴⁵ MONTIEL G., *et al.* Degradación de Pigmentos en Puré de Pimientos Verdes y Rojos por acción de la Radiación UV. Laboratorio de Tecnología Química, Argentina. [Citado en Junio de 1999]. Disponible en Internet: <<http://www.fdta-valles.org/Pages/Publica.html>>
- ⁴⁶ MELENDEZ-MARTÍNEZ, A., *et al.* Estabilidad de los pigmentos carotenoides en alimentos: Junio 2004. Vol. 54, No.2 [Citado Abril 2006]. Disponible en Internet: <URL: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttex&pid=s0004-0622200400020001&lng=es&nrm=iso.html>
- ⁴⁷ OLIVER JORDI, *et al.* Chromatographic determination of carotenoids in food. En: *Journal of chromatography A*. Vol 881, (2000); p.543-555

- ⁴⁸ MILLER, J.C Y MILLER, J.N. *Statistic for analytical Chemistry*, Ellis Horwood Limited Publ., Chichester, 1984. p 96-100
- ⁴⁹ DIAZ, I. y FARIÑAS, O. Validación del método analítico para la determinación de 3 vitaminas hidrosolubles en un suplemento vitamínico. En: *Rev Cubana Farm.* Vol 34, (2000); p. 93-99.
- ⁵⁰ HOWARD L.R., et al. Changes in Phytochemical and Antioxidant Activity of Selected Pepper Cultivars (*Capsicum Species*) as influenced by maturity. En: *Journal Agricultural Food Chemistry.* Vol 48, p. 1713-1720.