

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE CAPSAICINA A PARTIR DEL FRUTO DE
Ají (Capsicum chinense).

LYRIA YESENIA SILVA MENESES

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2008

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE CAPSAICINA A PARTIR DEL FRUTO DE
Ají (Capsicum chinense).

LYRIA YESENIA SILVA MENESES

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

DIRECTOR

JAIME MARTIN FRANCO Ph. D.

ASESOR

MARA ISABEL OROZCO, Qca.

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2008

CONTENIDO

RESUMEN	14
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
OBJETIVOS.....	16
OBJETIVO GENERAL.....	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
INTRODUCCIÓN	17
1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	19
1.1 ORIGEN, MORFOLOGÍA DEL CULTIVO Y CLASIFICACIÓN.....	19
1.2 COMPOSICIÓN.....	20
1.3 CAPSAICINOIDES	21
1.3.1 Capsaicina	22
1.3.2 Aplicaciones de la capsaicina	23
1.4 ANÁLISIS DE CAPSAICINOIDES.....	24
1.4.1 Procedimiento general para el análisis de capsaicina.....	24
2. METODOLOGÍA	27
2.1 EQUIPOS Y REACTIVOS.....	27
2.1.1 Equipos	27
2.1.2 Reactivos	27

2.2.2 Solventes	27
2.2 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE CUANTIFICACIÓN DE CAPSAICINA POR HPLC	28
2.2.1 Condiciones experimentales.....	28
2.2.2 Método de Cuantificación	28
2.3 ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	28
2.3.2 Precisión.....	29
2.3.3 Sensibilidad.....	29
2.3.4 Exactitud.....	29
2.4 CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL DE ENSAYO.....	30
2.4.1 Preparación del material de ensayo.....	30
2.4.2 Determinación de propiedades físicas y análisis proximal.....	30
2.4.3 Proceso de secado.....	31
2.5 EXTRACCIÓN DEL CRUDO (OLEORRESINA) DEL FRUTO DEL AJÍ.....	31
2.5.1 Metodología Soxhlet.....	31
2.5.2 Metodología percolación.....	31
2.6 PURIFICACIÓN DE CAPSAICINA	32
2.6.1 Purificación por extracción en fase sólida (SPE).....	32
2.6.2 Purificación por acomplejamiento con ion Plata.....	32
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
3.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE CUANTIFICACIÓN DE CAPSAICINA POR HPLC	34
3.1.1 Condiciones experimentales.....	34
3.1.2 Método de cuantificación.....	34

3.2 ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	35
3.2.1 Linealidad.....	35
3.2.2 Precisión.....	36
3.2.3 Sensibilidad.....	38
3.2.3 Exactitud.....	40
3.3 CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL DE ENSAYO.....	41
3.3.1 Determinación de las propiedades físicas y análisis proximal.....	41
3.4 EXTRACCIÓN DEL CRUDO (OLEORRESINA) DEL FRUTO DEL AJÍ.....	43
3.4.1 Metodología soxhlet.....	44
3.4.2 Metodología de percolación.....	46
3.5 PURIFICACIÓN DE CAPSAICINA.....	48
3.5.1 Purificación por extracción en fase sólida (SPE).....	48
3.5.2 Purificación por acomplejamiento con ion plata (Ag ⁺).....	53
4. CONCLUSIONES.....	63
BIBLIOGRAFIA.....	65
ANEXOS.....	71

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Corte polar del fruto de ají y sus partes.	22
Fig. 2. Cromatograma tridimensional del estándar de capsaicina (2.0 ppm).	35
Fig. 3. Curva de calibración para la determinación de capsaicina	36
Fig. 4. Curva de calibración para determinar LD y LC	39
Fig. 5. Cromatogramas superpuestos de los extractos de Capsaicina luego de 6 h de Extracción Soxhlet, empleando como solvente.....	44
Fig. 6. Peso de Capsaicina extraída del fruto de ají por metodología soxhlet con solventes diferentes	45
Fig. 7. Tiempo de máxima extracción de capsaicina del fruto de ají por metodología soxhlet con hexano.....	45
Fig. 8. Peso de capsaicina extraída cada 3 h a partir del fruto de ají por metodología percolación con hexano.....	46
Fig. 9. Comparación de las dos metodologías de Extracción con Hexano como solvente extractor de capsaicina.	47
Fig. 10. Cromatogramas de oleorresina después de eluir por cartucho C18.	49
Fig. 11. Cromatogramas de oleorresina después de eluir por cartucho con óxido de magnesio.....	50

Fig. 12. Cromatogramas de oleorresina después de eluir por cartucho Envicarb. 51

Fig. 13. Cromatograma de la oleorresina. (a) antes de ser eluída por el cartucho Envicarb; (b) después de ser eluida por el cartucho Envicarb. 53

Fig. 14. Cromatograma de capsaicina purificada por acomplejamiento con el ion plata. 56

Fig. 15. Superposición de los cromatogramas antes y después de la purificación 56

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Pungencia de algunos los capsaicinoides presentes en el fruto de ají.*. 21	21
Tabla 2. Clasificación de especies de ají según su pungencia aproximada 22	22
Tabla 3. Condiciones experimentales de cuantificación por HPLC..... 34	34
Tabla 4. Concentraciones del estándar y áreas de capsaicina para la curva de calibración 36	36
Tabla 5. Concentraciones del estándar de capsaicina y sus respectivas desviaciones estándar..... 37	37
Tabla 6. Repetitividad de la solución estándar 1.5 ppm de capsaicina, analizadas sucesivamente. 37	37
Tabla 7. Reproducibilidad de las concentraciones de tres estándares de capsaicina. 38	38
Tabla 8. Concentraciones del estándar de capsaicina y sus áreas par calcular LD y LC..... 39	39
Tabla 9. Valores de los límites de detección y cuantificación que representan la sensibilidad del método analítico. 40	40
Tabla 10. Parámetros de evaluación para determinar la exactitud del método 41	41
Tabla 11. Propiedades físicas del fruto de ají (variedad habanero)..... 42	42

Tabla 12. Análisis proximal de frutos de ají.	42
Tabla 13. Absorbancia determinada en el análisis de color extraíble de las muestras deshidratadas.....	43
Tabla 14. Cantidad de oleoresina obtenida en la extracción por metodología soxhlet y percolación.....	48
Tabla 15. Extracción en fase sólida para la purificación.	52
Tabla 16. Peso de capsaicina antes y después del proceso Envicarb –Plata. y porcentaje de rendimiento de la purificación	57
Tabla 17. Áreas de la curva de calibración de Capsaicina.	60
Tabla 18. Prueba de estabilidad de la lámpara y puerto de inyección un patrón de Capsaicina 0.5 ppm	62
Tabla 19. Cantidad de capsaicina contenida en la oleoresina obtenida por metodología soxhlet utilizando diferentes solventes capsaicina	75
Tabla 20. Cantidad de capsaicina contenida en la oleoresina obtenida por metodología soxhlet capsaicina.	75
Tabla 21. Cantidad de capsaicina contenida en la oleoresina obtenida por metodología percolación.	75
Tabla 22. Cantidad de capsaicina extraída por metodología percolación y soxhlet capsaicina.	76

Tabla 23. Peso de capsaicina antes y después del proceso Envicarb –Plata. y porcentaje de rendimiento de la purificación.....77

LISTA DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
Ae	Acetato de etilo
AOAC	Métodos oficiales de análisis
Cap	Capsaicina
CCD	Cromatografía de capa delgada
Dhcap	Dihidrocapsaicina
g	Gramos
h	Horas
Ha	Hectárea
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
M	Molaridad
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
nm	Nanómetros
°C	Grados Centígrados
ppm	Partes por millón
t_r	Tiempo de Retención
UV-Vis	Ultravioleta visible
v/v	Volumen/Volumen

RESUMEN

La pungencia del fruto de ají se atribuye a los capsaicinoides presentes en su pulpa, ellos en especial la capsaicina, tienen una amplia gama de aplicaciones en la industria farmacéutica, principalmente en la fabricación de medicamentos para el manejo del dolor crítico en neuropatía diabética, neuralgia postherpética, síndrome del dolor post-mastectomía y síndrome de la distrofia simpática refleja. También se ha empleado en tratamientos de enfermedades autoinmunes como Psoriasis, artritis y como repelente.

Considerando la importancia farmacológica de la capsaicina se desarrolló una metodología para su separación del fruto del ají, de la variedad *Capsicum chinense*, consiguiendo excelentes resultados en la extracción por metodología Soxhlet-Hexano y su aislamiento y purificación, mediante cromatografía en fase sólida, acopleamiento con ión plata y extracción líquido-líquido con diclorometano. La cuantificación se hizo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando un patrón comercial de capsaicina.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La economía del Departamento del Cauca depende en gran medida del crecimiento del sector agrícola, ligado a la inversión que se haga en el campo y al desarrollo de proyectos de investigación sobre el mejoramiento de la calidad de los productos del agro y la generación de valor agregado.

Aunque el sector agrícola del departamento ha estado asociado a un número no muy grande de cultivos, recientemente se están intentando nuevos cultivos como el del ají, el cual se muestra muy promisorio.

Hasta ahora, esta planta se ha cultivado para comercializar su fruto con fines de exportación. No se ha tenido en cuenta que ésta produce un grupo de sustancias llamadas capsaicinoides que son de gran valor en la industria farmacéutica, especialmente la capsaicina, cuya aplicación terapéutica es muy eficaz y además, un gramo de esta sustancia vendido en Colombia llega a costar alrededor de tres millones de pesos.

A la luz de estos hechos, se consideró importante, motivar el crecimiento del cultivo de ají, mediante la generación de valor agregado, a través de la extracción y purificación de la capsaicina a partir del fruto del ají (*Capsicum chinense*), con el fin de formalizar una metodología eficaz de aislamiento que en un futuro permita comercializar la capsaicina en lugar del fruto del ají, con mayores rendimientos económicos para los cultivadores.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un método efectivo y consistente de aislamiento y purificación de capsaicina a partir de extractos del fruto de ají (*Capsicum chinense*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Plantear un proceso de aislamiento y purificación de capsaicina por cromatografía de columna utilizando óxido de magnesio, carbono C-18 y carbón grafitizado como fases estacionarias.
- Cuantificar por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) la cantidad de capsaicina presente en los frutos de ají (*Capsicum chinense*).

INTRODUCCIÓN

El ají se ha cultivado desde épocas remotas en Centro y Suramérica, especialmente por la utilidad de sus frutos, el cual ha tenido diversos usos en alimentos y farmacología, siendo usado directamente o como extracto aceitoso denominado oleorresina, fuente de sustancias terapéuticas.

La oleorresina es usada como saborizante en salsas, guisos y colorantes naturales en productos procesados, bebidas no alcohólicas, confitería, carnes, sopas y en la industria cosmética gracias al contenido de carotenoides. El fruto de ají contiene capsaicinoides que presentan actividad biológica con capacidad anti-inflamatoria, analgésica y antioxidante, por ello, el fruto del ají ha sido usado durante muchos años en medicina tradicional para el tratamiento de la inflamación, torceduras y articulaciones dolorosas. El principal componente pungente terapéutico, es la capsaicina, utilizada para el manejo del dolor en artritis reumatoidea y la osteoartritis, neuropatía diabética, neuralgia postoperatoria y síndrome del dolor postmastectomía. También se emplea como bloqueador molecular para la activación celular en enfermedades autoinmunes. Además es utilizada con otros componentes en una mezcla para defensa personal y como insecticida y repelente contra algunos animales.

No obstante, la capsaicina pura, es una sustancia muy costosa, ya que, un gramo de ella colocado en territorio colombiano, cuesta aproximadamente tres millones de pesos. Atendiendo las consideraciones expuestas y teniendo en cuenta que la capsaicina es una sustancia comercial, se decidió buscar una metodología alternativa más eficaz de extracción y purificación a partir del fruto del ají.

Con este propósito se estudió una de las variedades de ají (*Capsicum chinense*), cultivadas en el norte del departamento del Cauca, consiguiendo desarrollar un procedimiento eficaz de separación y purificación de capsaicina a partir de extractos de frutos deshidratados.

La extracción se ensayó por metodología soxhlet y de percolación con etanol, acetona y hexano, obteniéndose los mejores resultados de extracción de capsaicina con soxhlet-hexano, a pesar que la cantidad de oleorresina fue mayor en la extracción soxhlet-etanol. La purificación de la capsaicina se hizo mediante extracción en fase sólida y acomplejamiento del fluido con el ion plata, seguido de una extracción líquido-líquido. La estandarización del método de cuantificación se hizo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), ya que es una técnica sensible y precisa.

1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

1.1 ORIGEN, MORFOLOGÍA DEL CULTIVO Y CLASIFICACIÓN

El ají o chile picante es una hortaliza herbácea (Perennial herbáceo) perteneciente a la familia de las Solanáceas y el género *Capsicum*, incluye más de 200 variedades, de las cuales las más cultivadas son *Capsicum annuum* de ajíes moderadamente picantes, *Capsicum frutescens* de ajíes más picantes y ajíes *Capsicum chinense* que son extremadamente picantes.

Esta planta nativa de la zona Húmeda media en América Latina¹, 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 para albergar las semillas con forma de riñón y textura lisa. En un gramo de fruto se pueden encontrar alrededor de 130 semillas². En el proceso de maduración cambia el color de los frutos según la variedad de verde, morado, amarillo, blanco o naranja, a rojo (en varios tonos), púrpura, amarillo, naranja, café, negro, castaño o pardo oscuro. La coloración es un indicativo de maduración y de la pungencia^{3,4}.

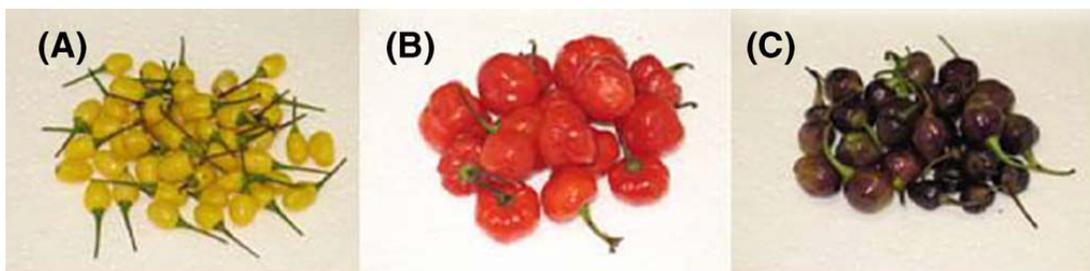


Fig. 1. Fotografías de tres variedades de ají *Capsicum chinense* sp. (A) Amarillo, (B) Rojo, (C) Púrpura.

El ají se clasifica por las características de la fruta, de pungencia, color, forma, sabor y tamaño. A pesar de sus rasgos diferentes, la mayoría de los cultivos de ají en el mundo pertenecen a la especie *Capsicum annuum*. El tabasco (*Capsicum frutescens*) y el habanero (*Capsicum Chinense*), son las excepciones más conocidas⁵.

Entre las variedades más representativas se encuentran: Habanero, Tabasco, Jalapeño, Hungarian, Yellow, Was, Chile, Floral Gem, Red Chili y Roumanian Hot⁶. Algunas de estas variedades han aumentado su popularidad en las regiones tropicales y subtropicales de Colombia, por su elevado poder nutritivo y rentabilidad para el productor.

1.2 COMPOSICIÓN

Los frutos de ají contienen sustancias lipofílicas mono, di y triglicéridos, ácidos grasos libres, pigmentos carotenos y carotenoides, aceites esenciales, resinas ácidas y sus ésteres, terpenos y sus productos de oxidación y polimerización, ceras, esteroides vegetales y capsaicinoides^{4,6}, estos últimos se encuentran en glándulas o receptáculos de la placenta y septas⁶. La composición de los metabolitos y depende del genotipo de la variedad, el grado de madurez del fruto, la interacción ambiente de crecimiento o de selección natural de las plantas, la interacción genotipo-ambiente y posibles situaciones estresantes^{7,8}.

Parte de estos metabolitos son extraídos en una sustancia oleaginosa denominada oleorresina, dependiendo del solvente y la metodología de extracción. Según estudios realizados en el grupo de investigación Química de Productos Naturales adscrito al departamento de Química de la Universidad del Cauca la mejor extracción de colorantes mayoritarios, capsantina y capsorubina se

consigue por metodología soxhlet-acetona, sin embargo, el etanol es el solvente que extrae mayor cantidad de oleorresina⁹.

1.3 CAPSAICINOIDES

Los capsaicinoides son las sustancias responsables de la pungencia del fruto del ají. Se agrupan según la cadena apolar de la molécula que varía en su tamaño que de 8-10 átomos de carbonos y la presencia de un doble enlace carbono-carbono y un grupo metilo presente en la capsaicina¹⁰.

Las sustancias pungentes son conocidas como capsaicinoides. Ellas son clasificadas según el nivel de pungencia mediante un método conocido como Test organoléptico Scoville, desarrollado en 1912 por el químico Wilbur Scoville¹¹. De acuerdo a este test, los capsaicinoides se clasifican como se muestra en la Tabla1.

Tabla 1. Pungencia de algunos los capsaicinoides presentes en el fruto de ají.*

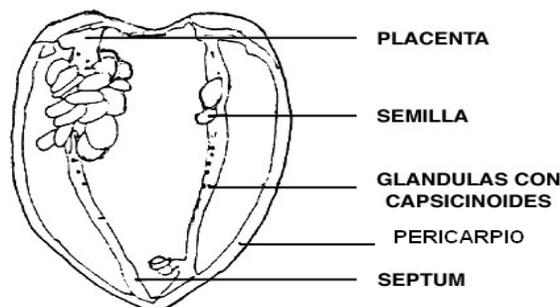
No.	Nombre común	Nombre IUPAC	Pungencia (U. Scoville)
1	Capsaicina	<i>N</i> -(4-hidroxi-3-metoxibencil)-8-metil-6-nonenamida	16.000.000
2	Dihidrocapsaicina	<i>N</i> -(4-hidroxi-3-metoxibencil)-8-metilnonanamida	16.000.000
3	Nordihidrocapsaicina	<i>N</i> -(4-hidroxi-3-metoxibencil)-7-metiloctanamida	9.100.000
4	Homocapsaicina	<i>N</i> -(4-hidroxi-3-metoxibencil)-9-metil-7-decenamida	8.600.000
5	Homodihidrocapsaicina	<i>N</i> -(4-hidroxi-3-metoxibencil)-9-metildecenamida	8.600.000

* Clasificación, Nomenclatura IUPAC y común

Los capsaicinoides son producidos en la placenta del pimiento por las glándulas, que se encuentran en la parte superior de la separación, inmediatamente por

debajo del tallo. La placenta es aproximadamente 16 veces más pungente que el pericarpio¹².

Fig. 2. Corte polar del fruto de ají y sus partes.



Algunos capsaicinoides encontrados en el ají tienen variaciones estructurales en la fracción hidrocarbonada, que influye en la habilidad de ligar a los receptores y de penetrar en las capas dérmicas de la lengua, boca, y garganta.

La concentración de capsaicinoides expresada en unidades de pungencia de Scoville, de algunas especies de ají es mostrada en la Tabla 2.

Tabla 2. Clasificación de especies de ají según su pungencia aproximada

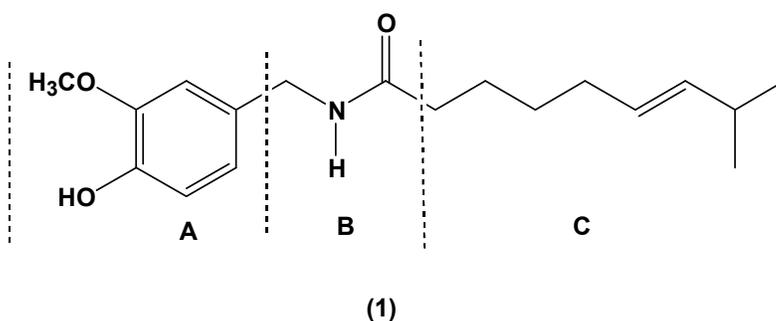
Tipo de Ají	Pungencia (U. Scoville) x10 ³	Tipo de Ají	Pungencia (U. Scoville) x10 ³
Habanero	200 - 300	Smoked	10
Red Amazon	75	Guajillo	5
Tabasco	30 - 50	Jalapeño	3.5 - 4.5
Cayenne	35	New Mexican	1
Serrano	7 - 25	Pimento	0

1.3.1 Capsaicina

La capsaicina, es un pseudo alcaloide, nombrado por la IUPAC como N-[(4-hidroxi-3-metoxifenil)metil]-8-metil-6-nonenamida¹³. Este compuesto es el principal componente activo, responsable de la pungencia de las plantas del género

Capsicum, derivado de la vainillilamina y el ácido E-8-metilnon-6-enoico. Su peso molecular es 305.199 Umas, es insoluble en agua y soluble en aceite mineral y vegetal, éter, acetona y etanol. En su forma pura es un cristal monocíclico translucido que funde a 64.5 °C y ebulle a 210–220 °C ¹⁴.

La capsaicina presenta en su estructura un grupo amido (región B), un anillo aromático hidrofílico (región A) y una cadena carbonada lipofílica (región C)¹³.



El grupo amido está asociado con su baja volatilidad y la ausencia de olor. Su larga cadena hidrocarbonada que permite a la molécula desplazarse por membranas celulares ricas en lípidos y además es responsable del fuerte enlazamiento con la lipoproteína receptor VR1, la cual tiene una cadena similar y es responsable de la percepción del intenso sabor y la sensación persistente de ardor.

1.3.2 Aplicaciones de la capsaicina

En la actualidad y a nivel mundial se realizan investigaciones sobre la actividad de los capsaicinoides que contiene el fruto del ají. Estas sustancias tienen actividad anti-inflamatoria, analgésica y antioxidante, es por ello, que el fruto del ají ha sido usado durante muchos años en medicina tradicional para el tratamiento de la inflamación de la piel, torceduras y articulaciones dolorosas¹¹. El principal de los componentes pungentes, es la capsaicina, la cual es efectiva para el manejo de condiciones dolorosas tales como artritis reumatoidea y la osteoartritis, neuropatía

diabética, neuralgia postherpética y síndrome del dolor postmastectomía. También se emplea como bloqueador molecular de la activación celular en enfermedades autoinmunes^{15,16}, y como un inhibidor del crecimiento de células cancerígenas, como anticoagulante y reductor de colesterol¹⁷.

Recientes investigaciones científicas demuestran que la capsaicina está relacionada con la disminución del riesgo de sufrir enfermedades degenerativas tales como el cáncer gástrico y de próstata, así como también de enfermedades cardiovasculares, degeneración muscular relacionada a la edad y formación de cataratas¹⁸.

A pesar de los grandes beneficios que se pueden obtener de la capsaicina, esta sustancia en altas concentraciones llega a ser muy tóxica, poniendo en tela de juicio su uso el tratamiento contra el dolor.

La capsaicina es también utilizada como insecticida y repelente contra perros, pájaros, venados, conejos, osos y ardillas; También se le ha otorgado la clasificación de pesticida bioquímico por la EPA en 1991¹⁹.

1.4 ANÁLISIS DE CAPSAICINOIDES

1.4.1 Procedimiento general para el análisis de capsaicina

La preparación de la muestra se realiza de la siguiente manera: eliminación de frutos defectuosos, corte, secado, molienda y tamizado. La muestra analítica se obtiene por el método de cuarteo y es almacenada bajo condiciones fitosanitarias adecuadas.

Extracción

En la literatura hay abundante bibliografía sobre la extracción de capsaicinoides por metodología de percolación, soxhlet, ultrasonido^{20,21,22}, microondas²³ y fluidos supercríticos²⁴. Algunos autores han reportado el uso de tratamientos enzimáticos para la extracción sin utilizar solventes²⁰.

Aislamiento

Recientemente ha disminuido el interés por el uso de columnas cromatográficas y semi-preparativas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), con diferentes fases estacionarias y fases móviles para eliminar la totalidad o la mayoría de los colorantes⁹, y parte de los capsaicinoides, debido a que son procesos dispendiosos y costosos^{9,25}. Algunos reportes resaltan la purificación mediante reacciones con compuestos inorgánicos²⁶ y orgánicos²⁷.

Por su parte, la cromatografía de capa fina (TLC), aunque es útil para identificar la capsaicina, no se recomienda en el análisis cuantitativo, por la dificultad para recuperar el analito y la eventual posibilidad de isomerización y oxidación en una superficie altamente expuesta. La separación cromatográfica de capsaicina puede realizarse mediante cromatografía de columna abierta (CCA), pero la exactitud y reproducibilidad de los resultados dependen de la habilidad del analista al empacar la columna y en el ajuste de los volúmenes y proporción de los solventes utilizados en la elución.

Identificación y cuantificación

A pesar del bajo interés por la cromatografía, la mayoría de los procedimientos para la identificación de capsaicina en muestras biológicas, se basan en la obtención del extracto crudo (oleorresina) y análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), utilizando columnas de C18, fases móviles de mediana y alta polaridad, con elusión isocrática^{13,28} o en gradiente¹¹ y detector UV-vis o de Fluorescencia^{7,17}.

La técnica de cromatografía GC-MS^{29,30,31} es empleada para identificar la capsaicina que está presente en el fruto del ají, pero su gran desventaja es la derivatización requerida para aumentar la volatilidad de éste compuesto. La espectrometría RMN ¹H y ¹³C también se ha empleado con éxito para caracterizar la capsaicina³², siendo necesario el aislamiento previo de esta sustancia.

2. METODOLOGÍA

2.1 EQUIPOS Y REACTIVOS

2.1.1 Equipos

- Espectrofotómetro Ultravioleta- visible GENESIS 6
- Cromatógrafo de líquidos HEWLETT PACKARD 1100, degasificador G 1322A, bomba cuaternaria G 1311A, detector UV-Vis G1314A, columna ZORBAX SB-C18 – (3.5 µm x 4,6 x 150 mm)
- Rota evaporador HEIDOLPH LABOROTA 4001
- Mini vap- Supelco con pipa de nitrógeno
- Planchas CORNING PC-420
- Balanza analítica PRECISA XT 220A (220 g/0.001 g)
- Horno FISCHER SCIENTIFIC-Modelo 851 F

2.1.2 Reactivos

- Capsaicina 65% Sigma-Aldrich
- Nitrato de Plata Mallinckrodt

2.2.2 Solventes

- Acetona 99.5 % Merck
- Hexano 98.5 % GR Fischer
- Etanol absoluto 99.9 % Mallinckrodt
- Metanol 99.98 % HPLC Merck
- Acetonitrilo 99.99 % HPLC Fischer
- Acetato de etilo 99.8 % Merck
- Diclorometano 98% Merck
- Ácido clorhídrico 36.5 - 38 % GR EM

2.2 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE CUANTIFICACIÓN DE CAPSAICINA POR HPLC

2.2.1 Condiciones experimentales

La determinación de capsaicina se llevó a cabo bajo las condiciones experimentales establecidas en investigaciones anteriores realizadas al interior del Grupo de Investigación Química de Productos Naturales adscrito al Departamento de Química de la Universidad del Cauca²¹.

2.2.2 Método de Cuantificación

La cuantificación de la capsaicina presente en el fruto del ají (*Capsicum chinense*), se realizó por curva de calibración, empleando soluciones patrón de capsaicina de concentraciones que oscilan entre 0.6 y 2.0 ppm. Se graficó el área bajo la curva registrado para la capsaicina versus la concentración de las soluciones patrón, con esto se obtuvo la ecuación de la curva de calibración. Finalmente, se determinó la concentración del analito a partir del valor medido del área bajo la curva²⁷.

2.3 ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Se determinaron las condiciones óptimas de trabajo en el equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), teniendo en cuenta los parámetros de: linealidad, precisión (repetitividad y reproducibilidad), sensibilidad (Límite de detección y límite de cuantificación) y exactitud.

2.3.1 Linealidad

La determinación de capsaicina por HPLC se hizo con soluciones estándar preparadas a partir de un patrón estándar de Capsaicina de 100ppm. Las

soluciones estándar de trabajo se prepararon con Acetonitrilo grado HPLC mediante diluciones para obtener concentraciones de 0.6 a 2.0 ppm. Cada solución patrón se analizó por triplicado. Posteriormente, se trazó la curva de calibración a partir de las áreas bajo la curva y sus respectivas concentraciones.

2.3.2 Precisión.

Para determinar el grado de concordancia entre los datos individuales y repetitividad de la técnica, cada punto de la curva se midió por triplicado determinándose la desviación estándar (s) y la desviación estándar relativa (RSD). Con el mismo fin, adicionalmente, fue medido 10 veces un estándar de 1.5 ppm bajo las mismas condiciones.

Otro parámetro evaluado fue la reproducibilidad del método analítico, en este se calculó la desviación estándar relativa de las soluciones patrón de capsaicina de 1.2, 1.5 y 1.8 ppm en cuatro días aleatorios durante 25 días.

2.3.3 Sensibilidad.

Para hallar la sensibilidad del método analítico se determinaron los límites de detección y de cuantificación, con una curva de calibración adicional con rango de concentración menor, entre 0.1 y 1.0 ppm. Cada punto se midió por triplicado para calcular la mínima concentración de capsaicina detectable y cuantificable por HPLC.

2.3.4 Exactitud.

La exactitud se calculó, evaluando la recuperación porcentual de capsaicina a partir de la curva de trabajo empleada para determinar la linealidad del método; la cual tienen un rango de concentración desde 0.6 hasta 2.0 ppm.

2.4 CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL DE ENSAYO

Esta investigación se centró en la variedad Habanero (*Capsicum chinense*), debido al alto grado de pungencia respecto a otras variedades cultivadas en el norte del departamento del Cauca.

2.4.1 Preparación del material de ensayo.

De las muestras recolectadas se seleccionaron los frutos en estado de maduración y se descartaron aquellos que presentaron sobremaduración, los frutos blando y de coloración clara, y aquellos que no cumplieron con las condiciones fitosanitarias mínimas para este estudio.

2.4.2 Determinación de propiedades físicas y análisis proximal.

Antes del proceso de extracción y cuantificación de capsaicina a partir del fruto del ají, se determinaron las propiedades físicas tales como color, forma, tamaño y peso. También se realizó el análisis proximal teniendo en cuenta las metodologías descritas en la AOAC, para determinar el contenido de agua por destilación (AOAC 986.21), proteína por el método Kjendhal (AOAC 920.165), grasa por soxhlet (AOAC 963.15), ceniza por gravimetría (AOAC 941.12), fibra bruta por Digestión (AOAC 920.169) y carbohidratos totales por diferencia de porcentaje al final de hallar los anteriores

La determinación del color extraíble se realizó con el fin de analizar la relación intensidad de color versus contenido de capsaicina, para ello fue necesario una extracción por percolación con acetona, según la American Spice Trade Association. (ASTA 1968 – método 20.1). 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 cobalto.

Las unidades de color fueron calculadas teniendo en cuenta el peso de la muestra y su absorbancia obtenida en espectrofotómetro UV-Vis.

2.4.3 Proceso de secado.

La muestra una vez cortada, se secó a 35 °C en estufa hasta que los frutos presentaron apariencia crujiente. Posteriormente se midió en un molino de disco y almacenadas en recipientes de vidrio, protegidas de la humedad.

2.5 EXTRACCIÓN DEL CRUDO (OLEORRESINA) DEL FRUTO DEL AJÍ

Por metodología soxhlet se evaluaron los solventes de diferente polaridad: etanol, acetona y hexano, respecto al porcentaje de capsaicinoides mayoritarios y el tiempo del proceso. El solvente con los mejores resultados, fue utilizado en la extracción por percolación a temperatura ambiente (Tabla 5). En ambos casos, el solvente se separó de la oleorresina por rotaevaporación con calentamiento a 50°C y presión reducida de 300 mm Hg.

2.5.1 Metodología Soxhlet.

Se utilizó un equipo soxhlet de 125 mL, 4.0 g de muestra deshidratada y 90 mL de solvente. El tiempo de extracción fue de 18 h, se analizaron alícuotas cada 3 h para determinar el tiempo de máxima extracción de capsaicina.

2.5.2 Metodología percolación.

Se extrajo oleorresina durante 18h a temperatura ambiente, a partir de 4.0 g de muestra deshidratada y 90 mL de hexano. El solvente se renovó cada 3 h.

2.6 PURIFICACIÓN DE CAPSAICINA

2.6.1 Purificación por extracción en fase sólida (SPE).

Uno de los procedimientos evaluados para la purificación de capsaicina fue la extracción en fase sólida con las fases estacionarias: C18, óxido de magnesio y carbón grafitizado. La capsaicina obtenida se cuantificó por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) usando detector de espectrofotometría UV- Vis.

2.6.2 Purificación por acomplejamiento con ion Plata.

Con base en la metodología reportada por Hisashi y colaboradores, se empleó nitrato de plata acuoso y extracciones líquido-líquido con hexano y diclorometano para obtener la capsaicina libre de Dihidrocapsaicina²⁶.

Con el fin de iniciar el aislamiento de la capsaicina a partir de la oleoresina extraída por metodología soxhlet, se lavó cuidadosamente un cartucho Envicarb (Carbón grafitizado) con metanol, agua ácido clorhídrico, acetonitrilo y finalmente con Hexano, con el fin de garantizar su limpieza y buenas condiciones para retener los colorantes de la oleoresina que se hizo eluir con hexano. Este paso se efectuó con 0.2g de Oleoresina seca, que al mezclarse con 5 mL hexano, formó un sólido brillante y un sobrenadante, luego esta suspensión se agitó y rápidamente se tomó una alícuota de 2.5 μ L que se le adicionó 2 mL con Acetonitrilo (ACN) para analizarlas por HPLC.

Posteriormente se pasó toda la muestra por cartucho Envicarb, utilizando Hexano como fase móvil (30 mL) y luego este se hizo eluir 10 mL de Acetato de Etilo para hacer eluir un poco de capsaicina que quedó retenida en la fase estacionaria. Los eluatos notablemente decolorados, se recolectaron, se concentraron hasta

sequedad y se pesó para seguir con el proceso de purificación, el tratamiento de la capsaicina con nitrato de plata.

Cada eluato obtenido con la extracción en fase sólida, se disolvió en 400 μ L de acetona y se trató con 0.6 mL de solución de nitrato de plata acuoso previamente neutralizado con hidróxido de amonio 0.1 M (pH= 6-7). Esta mezcla, se agitó mecánicamente con vortex a temperatura ambiente, a una velocidad 50 rpm aproximadamente, por 15 minutos. Enseguida se adicionó 0.7 mL Hexano para retirar la grasa, formándose dos fases, descartando la fase apolar (hexánica). La fase acuosa se trató con 660 μ L de Diclorometano, formándose de nuevo dos fases, la superior polar y la inferior apolar (*i*). la capa acuosa se extrajo de nuevo con 334 μ L de diclorometano (*ii*). Los extractos se reúnen y se concentraron con corriente de nitrógeno. Posteriormente, precipita un sólido blanco despues de adicionar 400 μ L de HCl 1 N, formándose dos fases. La fase acuosa se descartó y la fase apolar se concentró con nitrógeno hasta sequedad. Quedando un residuo mezclado con el sólido blanco el cual se trató con ACN, este se decantó, luego se concentró y pesó. Para la determinación y cuantificación por HPLC se adicionó 2 mL de ACN al residuo final.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE CUANTIFICACIÓN DE CAPSAICINA POR HPLC

3.1.1 Condiciones experimentales.

La estandarización del método de cuantificación por HPLC, se realizó siguiendo las condiciones de trabajo reportadas por SOLARTE, Carmen en su trabajo de grado²¹. Con base en los parámetros ilustrados en la Tabla 3, adecuados para la identificación de capsaicina en matrices complejas.

Tabla 3. Condiciones experimentales de cuantificación por HPLC.

PARÁMETRO	CARACTERÍSTICAS
Detector	UV vis λ : 280nm
Elusión	Isocrática
Flujo	0.5 mL/ min
Columna	ZORBAX SB-C ₁₈ (150mm x 4.6mm x 3.5 μ m)
Fase móvil	ACN : H ₂ O (70:30) v/v
Volumen de inyección	20 μ L
Patrón	Capsaicina: 65% Dihidrocapsaicina: 35%
Presión	39 - 40 bar
Tiempo de corrida	8 min

3.1.2 Método de cuantificación.

La cuantificación de capsaicina se realizó mediante curva de calibración, midiendo por triplicado el área de cada solución estándar de capsaicina bajo parámetros resumidos en la Tabla 3. La Figura 3 ilustra un cromatograma tridimensional de una de las soluciones estándar de capsaicina empleadas en la curva de calibración.

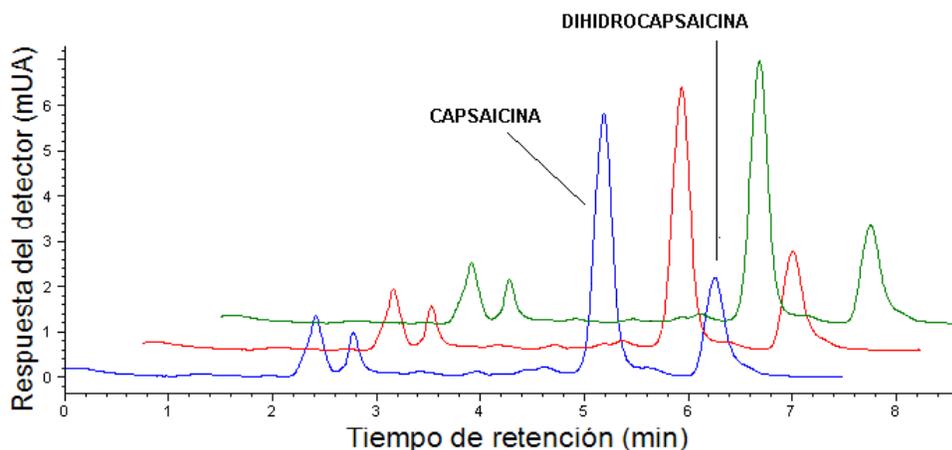


Fig. 3. Cromatograma tridimensional del estándar de capsaicina (2.0 ppm).

3.2 ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

La estandarización del método cromatográfico permitió establecer los límites prácticos de la técnica y la metodología empleada, al igual que asegurar la precisión y exactitud de los datos obtenidos.

3.2.1 Linealidad.

La curva de cuantificación de la capsaicina se muestra en la Fig. 4, esta se trabajó en un rango de concentración entre 0.6 y 2.0 ppm; mediante análisis por HPLC se obtuvo el área en unidades de absorbancia (mAU), la cual es proporcional a la concentración. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 4.

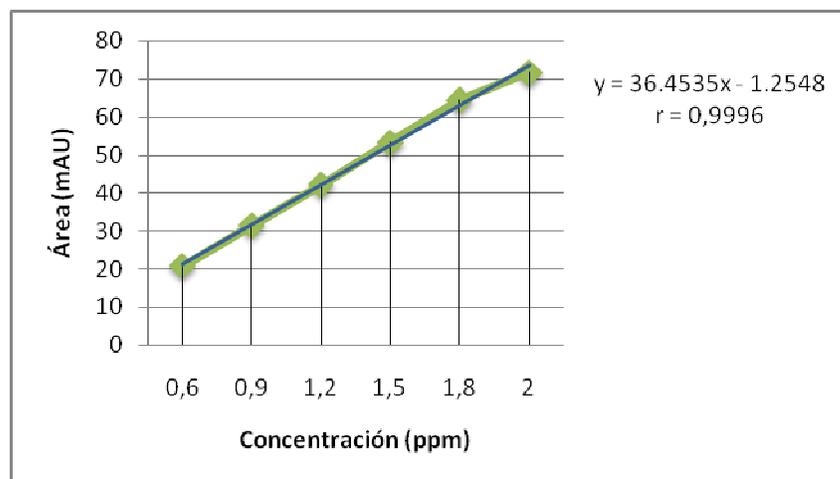


Fig. 4. Curva de calibración para la determinación de capsaicina

Tabla 4. Concentraciones del estándar y áreas de capsaicina para la curva de calibración

Concentración (ppm)	0.60	0.90	1.20	1.50	1.80	2.00
Área promedio (mAU)	20.8	31.53	42.23	53.30	64.53	71.7

En la Fig. 4 se observa el gráfico del área bajo la curva en función de la concentración de cada solución estándar obtenido de los datos reportados en la Tabla 4. El coeficiente de correlación de 0.9996, muy cercano a 1, evidencia una respuesta lineal entre el área registrada en el análisis cromatográfico y el rango de concentraciones trabajadas, es decir, casi todos los puntos se localizan en la línea recta³³, *r* indica que hay una correlación lineal significativa, por lo cual, es innecesario realizar el test estadístico donde se compara el valor *t* calculado con el valor *t* tabulado³³.

3.2.2 Precisión.

La precisión del método esta dada por el cociente de repetitividad/reproducibilidad expresado en valores de desviaciones estándar relativas (RSD).

La *repetitividad*, se determinó mediante análisis sucesivos por triplicado de soluciones estándar por HPLC, registrándose los valores reportados en la tabla 5.

Tabla 5. Concentraciones del estándar de capsaicina y sus respectivas desviaciones estándar

Concentración de capsaicina (ppm)	Área 1 (mUA)	Área 2 (mUA)	Área 3 (mUA)	Área promedio (mUA)	s	RSD (%)
0,6	20.9	20.7	20.8	20.80	0.10	0.48
0,9	31.8	31.5	31.3	31.53	0.25	0.79
1,2	42.1	42.3	42.3	42.23	0.12	0.27
1,5	53.5	53.3	53.1	53.30	0.20	0.37
1,8	64.8	64.3	64.3	64.46	0.29	0.45
2	71.9	71.3	71.9	71.70	0.35	0.48
Promedio						0.476

La repetitividad hallada por 10 replicas consecutivas se observa en la Tabla 6.

Tabla 6. Repetitividad de la solución estándar 1.5 ppm de capsaicina, analizadas sucesivamente.

Parámetro	Valores	
Área (mAU)	1	54,39
	2	54,63
	3	54,13
	4	53,07
	5	54,52
	6	53,78
	7	53,73
	8	54,64
	9	54,37
	10	54.57
Área promedio	54,183	
S	0,512	
RSD (%)	0,945	

De acuerdo a la Tabla 5 y 6, la desviación estándar relativa es menor del 1%, indicando que existe repetitividad del método cromatográfico para la cuantificación de capsaicina, con un parámetro de confianza del 95%^{27,33}.

La *Reproducibilidad*, se llevó a cabo en ocasiones diferentes (durante 25 días), analizando por HPLC tres soluciones patrón de capsaicina de diferente concentración. Los resultados encontrados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Reproducibilidad de las concentraciones de tres estándares de capsaicina.

[CAP] (ppm)	ÁREA				Área promedio (mUA)	s	RSD (%)
	Dia1 (mUA)	Dia2 (mUA)	Dia10 (mUA)	Dia 25 (mUA)			
1.20	42.23	42.10	42.56	43.00	42.47	0.40	0.95
1.50	53.30	53.53	53.83	54.38	53.76	0.47	0.87
1.80	64.53	64.80	64.70	65.50	64.88	0.43	0.66
Promedio de RSD (%)							0.82

De acuerdo a la tabla anterior, para un intervalo de aceptación del 95%, los datos encontrados indican que el método cromatográfico es reproducible, ya que la desviación estándar relativa (RSD) presenta valores menores al 2%.^{27,33} indicando que los datos obtenidos en el método de cuantificación de capsaicina son confiables.

Teniendo en cuenta los valores de desviación estándar relativa (RSD) expuestos en las Tablas 5 y 7, se halló el cociente repetitividad/reproducibilidad, obteniéndose un valor de 0.58. Este valor es menor al 1%, lo que representa que existen condiciones apropiadas para el análisis, con esto se indica que existe concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente, es decir que los errores aleatorios son pocos, y que por consiguiente se puede afirmar que el método de cuantificación de capsaicina por HPLC es confiable.

3.2.3 Sensibilidad

Para medir la sensibilidad del método analítico se determinó el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC).

La curva de calibración realizada para determinar LD y LC se muestra en la Fig. 5, los datos correspondientes a las áreas y las concentraciones de los patrones empleados para la construcción de la curva son registrados en la Tabla 8.

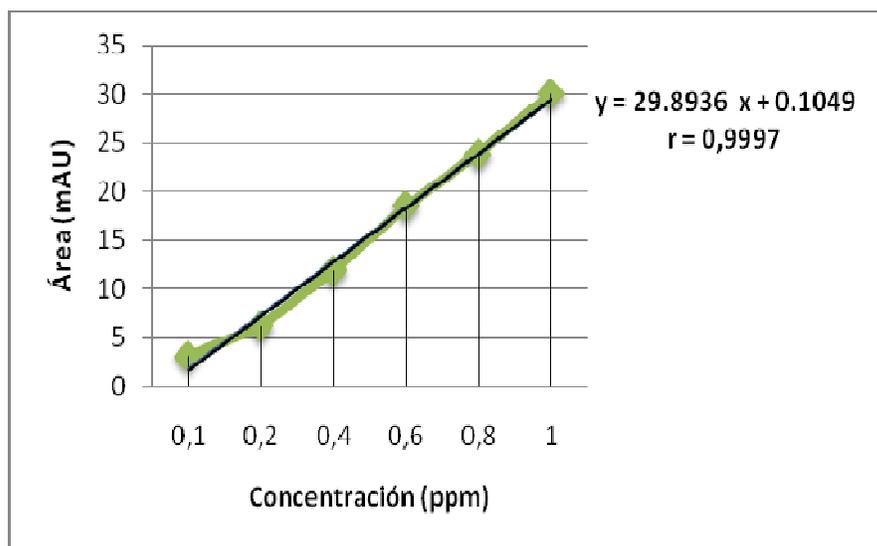


Fig. 5. Curva de calibración para determinar LD y LC

Tabla 8. Concentraciones del estándar de capsaicina y sus áreas par calcular LD y LC

Concentración (ppm)	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
Área (mAU)	3.03	6.13	11.86	18.50	23.77	30.00

En la Fig. 5, la ecuación obtenida presenta un coeficiente de correlación de 0.9997, valor muy cercano a 1, afirmando que los resultados tienen un ajuste al modelo lineal propuesto por la ecuación.

Con la ecuación de la recta (Fig. 5) se extrapola la respuesta a concentración cero, obteniéndose un estimado de la respuesta del blanco Y_b .^{27,33}.

Igualmente, se determinó la desviación estándar del blanco y con las formulas registradas en el anexo I se determinaron los límites de detección y cuantificación de la capsaicina, los cuales se exponen en la Tabla 9²⁷.

Tabla 9. Valores de los límites de detección y cuantificación que representan la sensibilidad del método analítico.

Parámetro	Valor
Respuesta del blanco (Y_B)	0.105
Desviación estándar del blanco (S_B)	0.362
Límite de Detección de Capsaicina (ppm)	0.036
Límite de Cuantificación de Capsaicina (ppm)	0.121

De acuerdo a la tabla anterior se encontró que la metodología propuesta es sensible en la determinación de capsaicina en muestras de ají por HPLC debido a que el límite de detección obtenido se encuentra en niveles hasta de 0.04 ppm

Con los resultados obtenidos, tanto en la reproducibilidad como en la repetitividad, se obtuvieron RSD menores al 2%, lo que permite realizar mediciones precisas en la determinación de los capsaicina 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 metabolitos secundarios en muestras vegetales como la capsaicina.

3.2.3 Exactitud

La exactitud del método analítico, se determinó con el valor de t - student teniendo en cuenta los datos obtenidos en la curva de calibración de capsaicina, los datos hallados se registran en la Tabla 10.

La recuperación porcentual (R) promedio total se obtuvo a partir de los valores promedio de cada solución patrón analizada por triplicado en relación a los datos de la curva de calibración reportados en la Tabla 5. De igual forma, se determinó la desviación estándar relativa promedio total, para encontrar el valor de t -student calculado mediante la ecuación (o) del anexo 1. El número de datos empleado es de 15, se utiliza $n-1$ grados de libertad con un intervalo de confianza del 95% para encontrar el valor de t tabulado ($t_{tab} = 2.12$)³³.

Tabla 10. Parámetros de evaluación para determinar la exactitud del método

Concentración (ppm)	Recuperación porcentual (R)			R promedio	s	RSD
	R1	R2	R3			
0,1	99.52	102.42	99.52	100.49	1.67	1.66
0,3	89.62	92.38	93.61	91.87	2.04	2.22
0,5	101.19	100.24	100.95	100.79	0.49	0.49
0,7	100.19	101.13	101.69	101.00	0.76	0.75
0,9	100.31	100.78	100.00	100.36	0.39	0.39
Promedio =				98.90	1.07	1.10
$t_{cal} =$						0.26

De acuerdo a los datos registrados en la Tabla 10, el valor de t calculado es menor que el t tabulado ($0.26 < 2.12$) indicando que no existen diferencias significativas en la recuperación por consiguiente la exactitud del método para determinar capsaicina por HPLC es apropiada.

3.3 CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL DE ENSAYO

3.3.1 Determinación de las propiedades físicas y análisis proximal.

En la Tabla 11 se portan las propiedades físicas de los frutos de ají (*Capsicum chinense*) variedad habanero.

Tabla 11. Propiedades físicas del fruto de ají (variedad habanero)

Propiedad	Valor
Longitud (promedio)	4.60 cm
Peso (promedio)	9.74 g
Color	Naranja
Forma	Corazonada

La Tabla 12, reporta el análisis proximal del fruto de ají *Capsicum chinense* variedad habanero. Se observa un bajo contenido de grasa y proteína, lo cual es característico del estado de maduración del fruto y la variedad.

Tabla 12. Análisis proximal de frutos de ají.

Parámetro	Valor (g/100 g muestra)
Humedad	79.98
Materia seca	20.02
Cenizas	1.42
Proteína	0.53
Grasa	0.78
Fibra bruta	9.39
Carbohidratos totales	17.29

El bajo contenido de grasa se asocia con un contenido bajo de capsaicina y de carotenoides⁸. También se refleja en el alto contenido de fibra bruta que es fuente de polisacáridos (celulosa, ligninas, etc.)^{4,7,8}.

Determinación de color extraíble, expresado en unidades ASTA

Teniendo en cuenta, la coloración naranja del fruto de estudio y el valor de color extraíble en unidades ASTA, presentado en la Tabla 13, se dedujo que el total de carotenoides presente en el fruto es relativamente bajo comparado con artículos

de autores como Cezar y colaboradores³⁴, quienes reportan más de 240 unidades ASTA para frutos deshidratados en estado de maduración adecuado. Este resultado es un indicativo de la baja concentración de capsaicina dentro del fruto, la cual se incrementa con la maduración.

Tabla 13. Absorbancia determinada en el análisis de color extraíble de las muestras deshidratadas.

Parámetro	Peso de la muestra (g)	Absorbancia	Unidades ASTA
Color extraíble	0.02	0.028	175.49
	0.02	0.028	175.49
	0.02	0.032	200.56
	0.02	0.032	200.56
	0.02	0.033	206.83
	0.02	0.035	219.36
Promedio			196.38

Las unidades de color fueron calculadas a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Color extraíble [Unidades ASTA]} = \frac{98.4}{w} \times \left(\frac{A_m}{A_s} \right)$$

A_s : Absorbancia promedio del estándar

A_m : absorbancia de la muestra

w: masa de la muestra deshidratada

3.4 EXTRACCIÓN DEL CRUDO (OLEORRESINA) DEL FRUTO DEL AJÍ

Para la obtención del crudo a partir del fruto del ají, se emplearon las metodologías soxhlet y percolación, en ellas se evaluaron parámetros como tiempo de extracción y porcentaje de capsaicina extraída obteniéndose datos que se muestran en las Figuras 6 y 7.

3.4.1 Metodología soxhlet.

El solvente adecuado para la extracción de la capsaicina presente en el fruto de ají *Capsicum chinense*, se escogió por cromatografía líquida de alta resolución HPLC, mediante el análisis de la cantidad de capsaicina que estaba presente en la oleorresina. El análisis por HPLC se hizo con intervalos de 3 horas, durante el proceso de extracción soxhlet.

A continuación, en la Figura 6, donde se ilustra la superposición de tres cromatogramas obtenidos de inyectar soluciones de oleorresina extraída luego de 6 h de extracción.

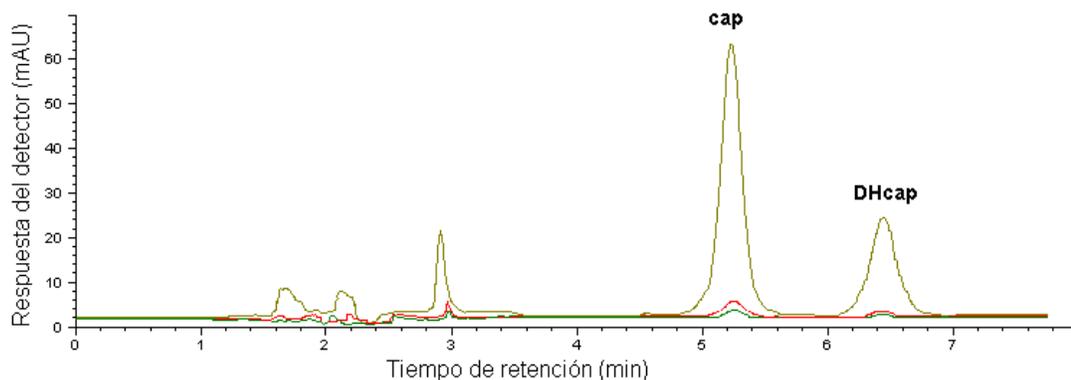


Fig. 6. Cromatogramas superpuestos de los extractos de Capsaicina luego de 6 h de Extracción Soxhlet, empleando como solvente: Hexano (---), Acetona (---) y Etanol (---)

En la Figura 6, se observa claramente que el solvente que más extrae capsaicina es hexano, seguido de acetona, siendo etanol el solvente que menos cantidad extrae. Esto se compara más puntualmente por medio de un diagrama en la Figura 7 donde se ilustra el contenido de capsaicina extraído cada 3h durante 18 h continuas.

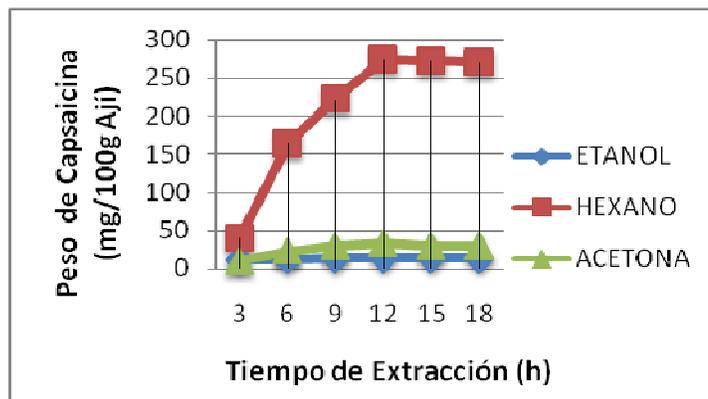


Fig. 7. Peso de Capsaicina extraída del fruto de ají por metodología soxhlet con solventes diferentes (expresado en 100g de Base seca)

Como se muestra en la Figura 7, la mejor extracción se hizo con hexano con rendimiento muy superior al conseguido con los otros solventes. La extracción más alta se consiguió después de 12 horas, manteniéndose constante después de este tiempo. Con base en esta medida se estimó el tiempo de máxima extracción de capsaicina entre 9 y 14 horas, monitoreando por HPLC la cantidad de capsaicina obtenía cada hora, es decir a las 9, 10, 11, 12, 13, y 14 horas de extracción. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la gráfica de la Figura 8.

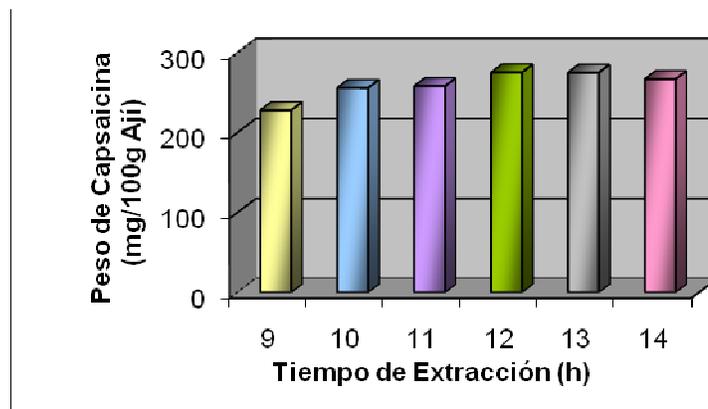


Fig. 8. Tiempo de máxima extracción de capsaicina del fruto de ají por metodología soxhlet con hexano.

Se confirmó que a las 12 h, la extracción era máxima disminuyendo ligeramente después de este tiempo.

3.4.2 Metodología de percolación.

Los ensayos por metodología de percolación con hexano, se hicieron evaluando la cantidad de capsaicina extraída cada 3h, en seguida se hizo la renovación del solvente.

La Figura 9, ilustra la cantidad de la capsaicina extraída por metodología de Percolación, a las 3, 6, 9, 12,15 y 18h

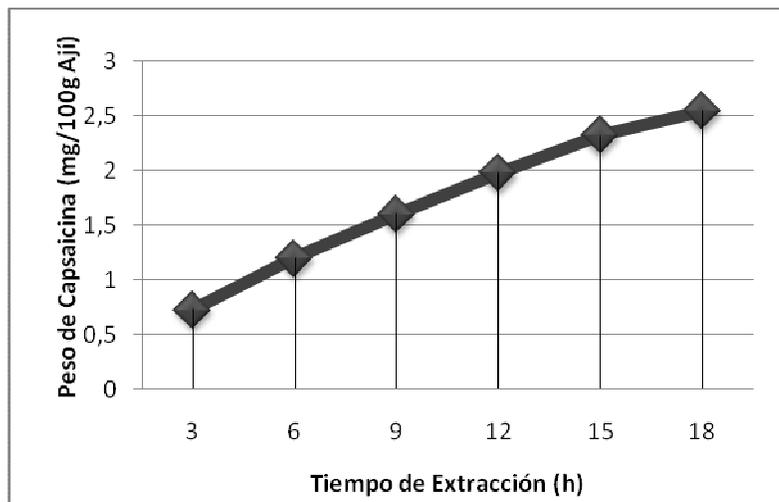


Fig. 9. Peso de capsaicina extraída cada 3 h a partir del fruto de ají (por 100 g de Base seca), por metodología percolación con hexano

En la figura anterior, se observa que la extracción de capsaicina es continua a medida que se hacen las renovaciones de solvente extractor, hexano.

En la Fig. 10, se compara la cantidad de capsaicina extraída por las metodologías soxhlet y percolación empleando hexano con monitoreo por HPLC cada 3h.

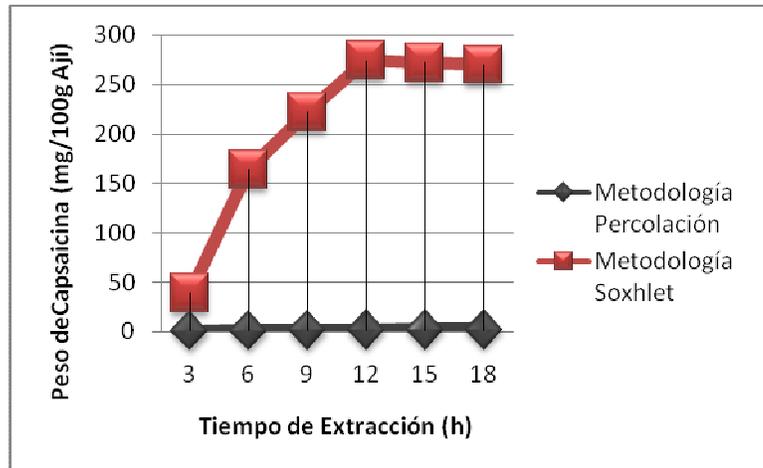


Fig. 10. Comparación de las dos metodologías de Extracción con Hexano como solvente extractor de capsaicina.

Se observa en la Figura 9, existe una notable diferencia entre los métodos de extracción por lo que se escogió la metodología soxhlet con hexano para la obtención de la oleorresina.

Al finalizar las extracciones por las metodologías soxhlet y percolación se realizó la determinación del porcentaje de oleorresina obtenida luego de realizar estos procedimientos por 18 horas continuas. Los resultados se reportan en la Tabla 14, se evidencia que empleando la metodología soxhlet con etanol como solvente, se extrae el mayor porcentaje de oleorresina, seguido de hexano y acetona. Por su parte, en las Figuras 6 y 7, se visualiza que la mayor cantidad de capsaicina se extrae utilizando hexano, esto probablemente se deba a la afinidad de polaridades entre el solvente y la capsaicina que tiene un extremo hidrocarbonado apolar.

Tabla 14. Cantidad de oleorresina obtenida en la extracción por metodología soxhlet y percolación.

	METODOLOGÍA	SOLVENTE		
		Etanol	Acetona	Hexano
% de oleorresina (p/p)	Soxhlet	15.36	6.77	8.55
	Percolación	-	-	4.10

Por consiguiente, con los resultados reportados en la Tabla 14 y graficados en la Figura 7, es evidente que se obtuvo mayor cantidad de capsaicina por metodología soxhlet - hexano, siendo este procedimiento más eficiente que el de percolación, debido al efecto de la temperatura y a la mayor afinidad de la capsaicina por el hexano. Igualmente, esto es una respuesta a la saturación que sufre el solvente en el proceso de percolación, contrario a lo que sucede en la extracción Soxhlet.

3.5 PURIFICACIÓN DE CAPSAICINA.

3.5.1 Purificación por extracción en fase sólida (SPE).

La purificación de capsaicina por extracción en fase sólida, se realizó con las siguientes fases sólidas: C18, oxido de magnesio y carbón grafitizado (Envicarb). A su vez se emplearon como eluentes acetonitrilo, acetonitrilo-agua (7:3) y acetonitrilo-metanol (7:3). Los cromatogramas correspondientes son ilustrados en las Figuras 11, 12 y 13, posteriormente en la Tabla 15 se muestran los resultados obtenidos. En la Figura 11 se exponen los cromatogramas obtenidos en el análisis por HPLC de la oleorresina luego de la extracción por fase sólida empleando C18 como fase estacionaria.

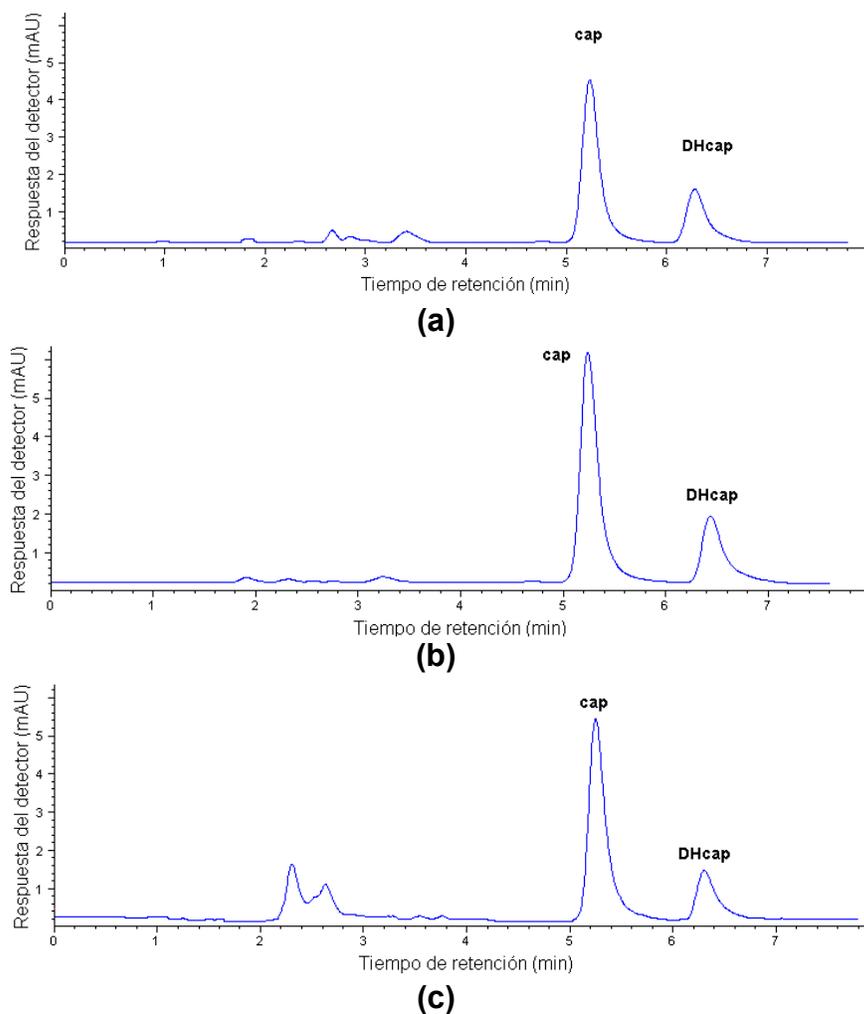


Fig. 11. Cromatogramas de oleorresina después de eluir por cartucho C18. (a) Fase móvil: 100% ACN; (b) Fase móvil: ACN/H₂O; (c) Fase móvil: 7:3 ACN/MeOH

En los cromatogramas expuestos en la Figura 11 se observa que la extracción en fase sólida empleando C18 como fase estacionaria, no proporcionó buenos resultados de aislamiento de la capsaicina, puesto que permitió eluir la capsaicina junto con la dihidrocapsaicina a la vez que permitió eluir impurezas, como es el caso de la Fig. 11 b.

En la Figura 12, se observa que el Oxido de Magnesio, con las fases móviles empleadas no representan un procedimiento efectivo para aislar la capsaicina de la dihidrocapsaicina, y además no se retienen los contaminantes que se quieren

eliminar, representados por los picos con tiempos de retención entre 2 y 3 minutos.

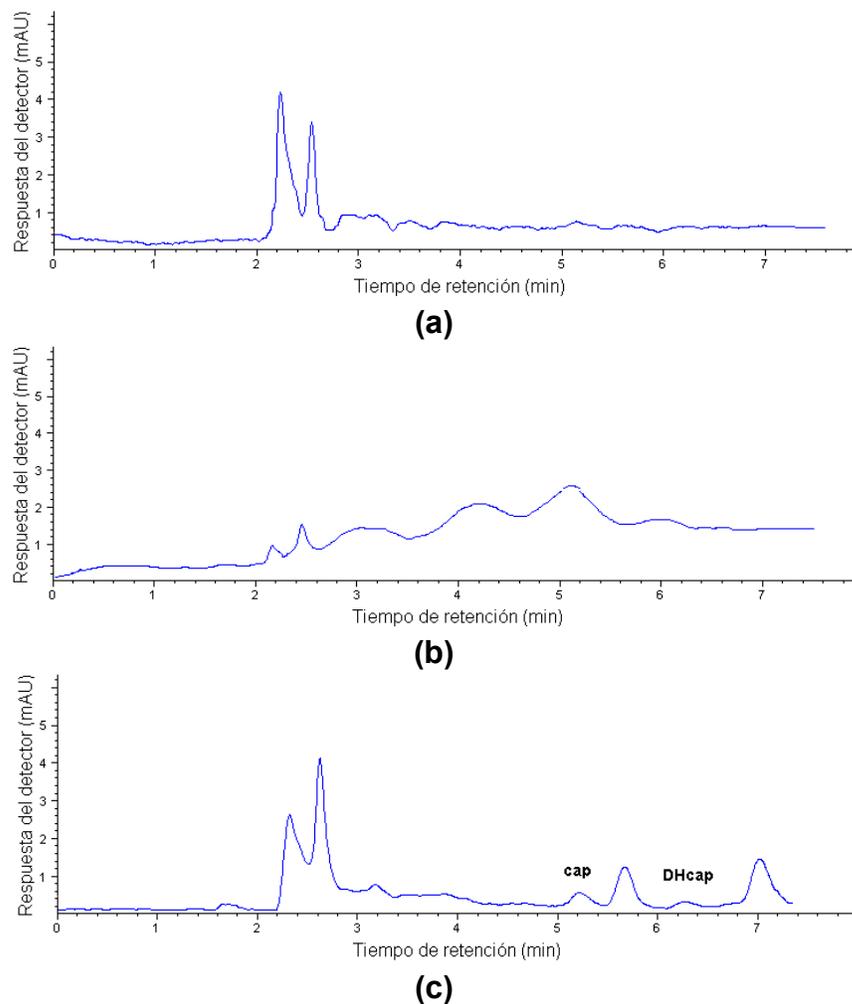


Fig. 12. Cromatogramas de oleorresina después de eluir por cartucho con óxido de magnesio. (a) Fase móvil: 100% ACN; (b) Fase móvil: 7:3 ACN/H₂O; (c) Fase móvil: 7:3 ACN/MeOH

En estos cromatogramas se observa una resolución muy baja. El cromatograma (a) obtenido con ACN como fase móvil, muestra que los capsaicinoides son retenidos fuertemente y solamente eluyen otras sustancias. En el cromatograma (b) se observa un notorio solapamiento de los picos característicos de la muestra. En tanto, que el cromatograma (c) obtenido con ACN más MeOH (7:3) como fase

móvil, muestra que la mayoría de la capsaicina es retenida en la fase estacionaria y además hay elución de muchas impurezas que se desean eliminar.

Por otra parte, en los cromatogramas (a), (b) y (c) mostrados en la Figura 13, se observa un comportamiento similar al presentado en la Fig. 11. Ya que no se consiguió el aislamiento de la capsaicina con las fases móviles empleadas, permitiendo a su vez la elución de contaminantes.

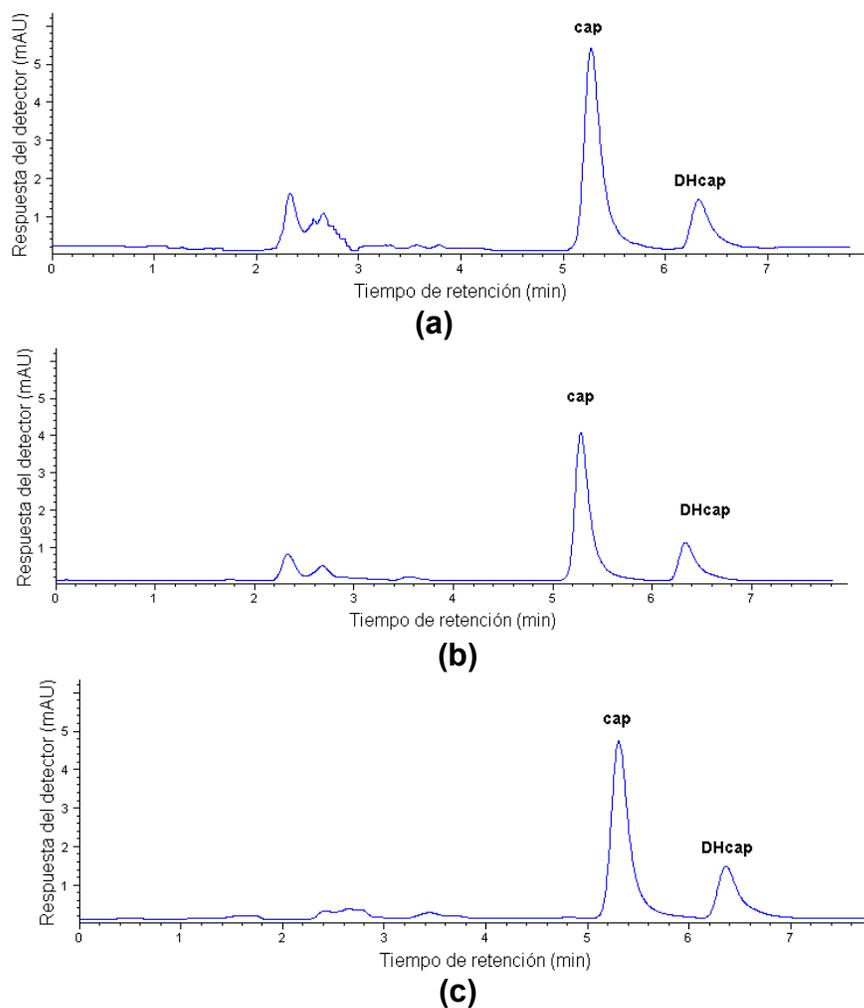


Fig. 13. Cromatogramas de oleorresina después de eluir por cartucho Envicarb. (a) Fase móvil: 100% ACN; (b) Fase móvil: 7:3 ACN/H₂O; (c) Fase móvil: 7:3 ACN/MeOH

A continuación en la Tabla 15, se resumen los resultados obtenidos en la purificación por extracción en fase sólida (SPE) con C 18, óxido de magnesio y Envicarb como fases estacionarias.

Tabla 15. Extracción en fase sólida para la purificación.

FASE ESTACIONARIA	FASE MÓVIL	Retención de color	Retención de Cap	Retención de DHCap
C-18	100% ACN	±	-	-
	7:3 ACN/H ₂ O	±	-	-
	7:3 ACN/MeOH	±	-	-
Óxido de Magnesio	100% ACN	+	+	+
	7:3 ACN/H ₂ O	+	+	+
	7:3 ACN/MeOH	+	+	+
Envicarb	100% ACN	-	-	-
	7:3 ACN/H ₂ O	-	-	-
	7:3 ACN/MeOH	-	-	-
	100% Hexano	+++	-	-

(+) retención positiva; (-) retención negativa; (±) retención parcial, según apreciación visual.

Se observa que el cartucho C-18 retuvo parcialmente los colorantes. La extracción con el cartucho Envicarb, con las fases móviles ACN, ACN/H₂O y ACN/MeOH, no retuvo ninguna de las sustancias de interés, con hexano presentó menor retención de capsaicina y un alto grado de decoloración de la oleorresina. En tanto, que con óxido de magnesio y los solventes ACN, ACN / H₂O, ACN / MeOH, retuvieron tanto la capsaicina como la dihidrocapsaicina y los colorantes. Por consiguiente, la purificación de capsaicina por extracción en fase sólida (SPE) solo proporcionó buenos resultados con el cartucho Envicarb y hexano como eluyente en la eliminación del color y baja retención de de capsaicinoides. Con este resultado, se decidió utilizar el sistema Envicarb-Hexano como parte del procedimiento para purificar la capsaicina.

En la Figura 14a se muestra el cromatograma de la oleorresina antes de pasar por la fase estacionaria Envicarb - hexano, se observan impurezas junto a la

Capsaicina y la Dihidrocapsaicina que contiene la oleorresina. El cromatograma (b) muestra que las impurezas han sido eliminadas, es decir, han quedado retenidas en el cartucho.

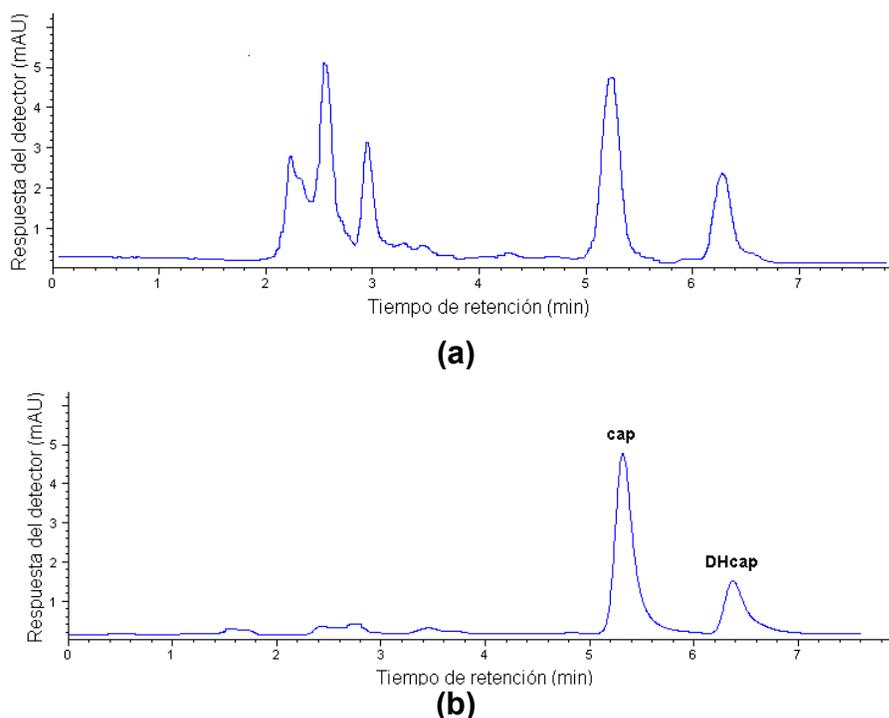


Fig. 14. Cromatograma de la oleorresina. (a) antes de ser eluída por el cartucho Envicarb; (b) después de ser eluída por el cartucho Envicarb.

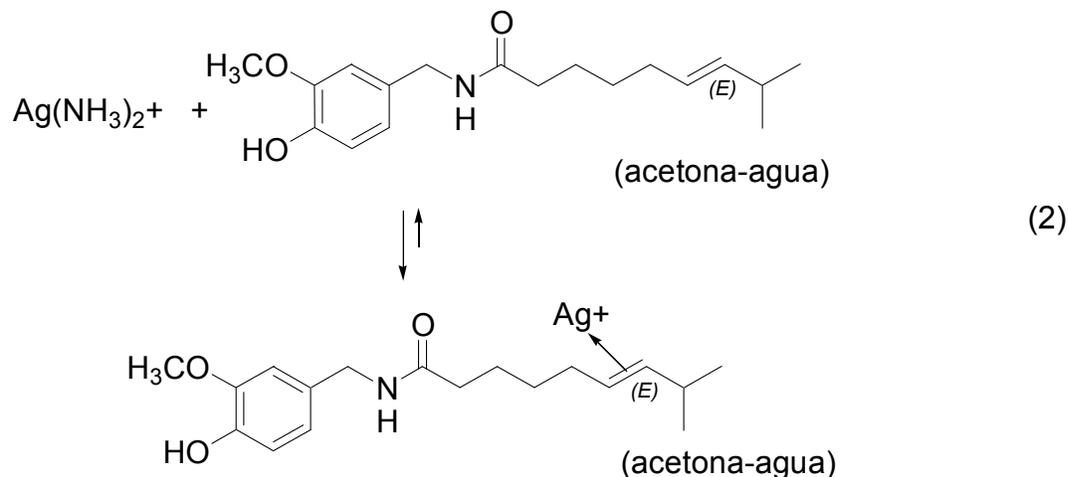
3.5.2 Purificación por acomplejamiento con ion plata (Ag^+).

El eluato obtenido con la fase estacionaria de carbón grafitizado Envicarb, se concentro hasta sequedad y se disolvió en acetona³⁵, luego se mezcló con nitrato de plata amoniacal, producido mediante la reacción de nitrato de plata acuoso con hidróxido de amonio (Ec. 1).



De esta manera se generó el ion $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$, que facilitaría la unión del ion Ag^+ con el ligando olefínico del extremo hidrocarbonado de la capsaicina, generando una

unión por transferencia electrónica entre el metal y el doble enlace que tiene la capsaicina en su cadena apolar³⁶ tal como se muestra en la Ec. 2.



Posteriormente, se realizó una extracción con hexano con el fin de eliminar algunas partículas grasas y carotenoides que no fueron retenidas en el cartucho Envicarb, de esta manera se obtuvo dos fases, una polar acetona-agua y otra apolar de hexano.

La fase polar, contiene el complejo plata-capsaicina solvatado por las moléculas del agua, unidas por medio de puentes o enlaces de hidrógeno.

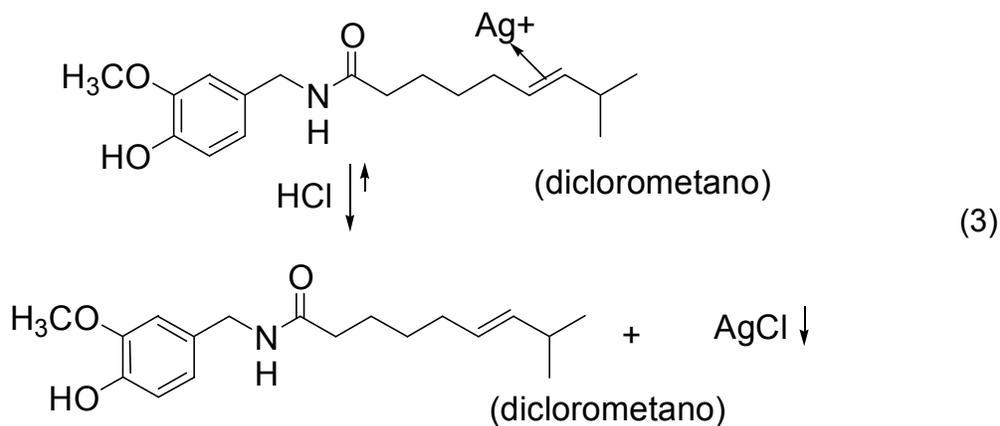
En el complejo capsaicina-plata, la capsaicina se comporta como un ligando con dos electrones. Los complejos que contienen este tipo de ligando, se preparan como en este caso por sustitución de algunos muy débiles, tales como las moléculas de amoníaco.²⁷

Enlace, la capsaicina con un extremo olefínico rico en electrones, dona electrones desde un sistema π al ión plata. No existe un enlace preferido del metal con un determinado átomo de carbono. Este enlazamiento es de tipo π , ya que incluye el solapamiento del orbital π del ligando con los orbitales $d z^2$ vacíos del metal^{17, 36}, denominado E-2.

La adición de diclorometano³⁷ originó dos fases inmiscibles, y al agitarse suavemente ocurrió la transición del complejo capsaicina-plata a la fase de diclorometano por anulación de la interacción del ión plata con las moléculas de agua, debido a una interacción más fuerte con el diclorometano.

La interacción diclorometano-plata cindujo al debilitamiento de la unión capsaicina-plata, la cual se rompe definitivamente cuando se adiciona el ácido clorhídrico (HCl) produciéndose un precipitado blanco de cloruro de plata y la liberación de la capsaicina en el diclorometano.

Según el reporte de Hotel'nicova y colaboradores, el ion plata acomplejado con amoniaco genera oxidación de alcoholes alifáticos primarios y secundarios en medio acuoso. En nuestro caso este caso las condiciones no fueron suficientes para la oxidación final de la capsaicina, debido a que la formación de hidroquinonas sugiere oxidantes más enérgicos.



Finalmente, la fase acuosa se descartó y la fase orgánica se concentró quedando un residuo al cual se adicionó ACN y se decantó conservando el líquido que fue concentrado para luego mezclarlo con 2 mL de ACN y analizarlo por HPLC, lo que reveló la presencia de capsaicina pura, libre de dihidrocapsaicina como se observa en el cromatograma de la Fig.15.

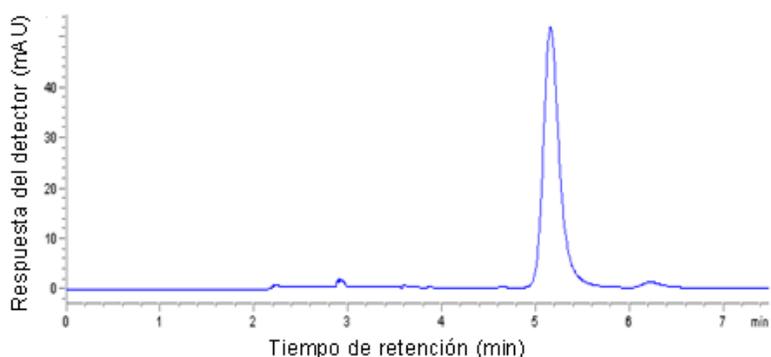


Fig. 15. Cromatograma de capsaicina purificada por acomplejamiento con el ión plata.

En la Fig.16 se observan los cromatogramas superpuestos de la capsaicina aislada y cuando está junto a otros capsaicinoides. Se puede observar la eliminación total de la dihidrocapsaicina y otros contaminantes presentes en la mezcla.

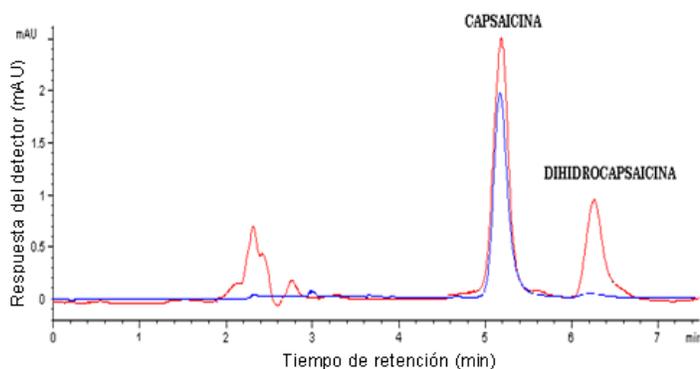


Fig. 16. Superposición de los cromatogramas antes y después de la purificación

No obstante es preciso mencionar que parte de plata hidratados pueden haber quedado sin sustituir por el ion amonio, lo que podría a su vez provocado interacciones del ión plata con el grupo alcohol del anillo aromático.

Teniendo en cuenta la efectividad del procedimiento mencionado anteriormente, se realizó la cuantificación teniendo en cuenta los pasos más significativos, designados como A, B y C, de esta forma verificar en cual de ellos se presenta la mayor pérdida de capsaicina.

En la Tabla 16 se reportan los resultados obtenidos en el proceso realizado por triplicado. Se observa que la cantidad de capsaicina obtenida por cada 100g de fruto deshidratado, es de 133,81 mg logrado al final del procedimiento. No obstante, el porcentaje de rendimiento es bajo, lo que indica pérdida de capsaicina durante el proceso, posiblemente se debe al error sistemático en este proceso, ya que las cantidades de solventes y reactivos empleados fueron del orden de los microlitros.

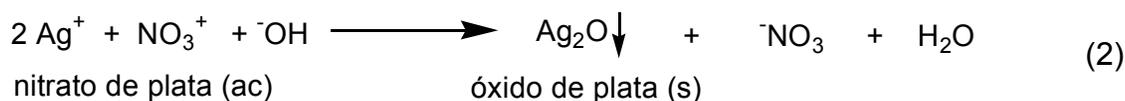
Sin embargo, en menor proporción, la retención de capsaicina en el cartucho puede ser otro factor que influyó en el porcentaje de rendimiento. Para lograr la purificación de capsaicina mencionada anteriormente, fue necesario realizar modificaciones en las etapas del proceso para llegar a un porcentaje de 48.62% como se reporta en la siguiente Tabla.

Tabla 16. Peso de capsaicina en mg por 100 g de fruto seco, antes y después del proceso Envicarb –Plata. y porcentaje de rendimiento de la purificación

ETAPAS*	ENSAYOS					
	1		2		3	
	peso	%	peso	%	peso	%
A	277,54		281,01		267,03	
B	276,55		279,01		266,46	
C	136,23	49,08	136,32	48,51	128,89	48,27
Peso Promedio de Capsaicina aislada				133,81 mg / 100g Ají		
Rendimiento Promedio				48,62 %		

* **A:** antes de la extracción. **B:** después de la extracción. **C:** peso de capsaicina y rendimiento después del procedimiento de purificación.

Inicialmente, sin usar el cartucho Envicarb se realizó un ensayo de acomplejamiento con el ion plata, empleando el sobrenadante y la solución acuosa de nitrato de plata neutralizada con hidróxido de sodio (NaOH). Esto generó un solido color marrón de oxido de plata (Ec. 2).



La formación de estas partículas sólidas impidió una buena separación de la capsaicina, debido a que la plata no estaría en solución, dispuesta para acomplejarse con la capsaicina. En este caso, el rendimiento del proceso fue de 25.88%

En otro ensayo se empleó el sobrenadante y el sólido con la solución acuosa de AgNO_3 tratada con NaOH, obteniéndose un rendimiento del 32.23%. Con el fin de mejorar el proceso y retirar parte de los carotenoides, se separó previamente con cartucho Envicarb y 30 mL de Hexano (100%). En esta ocasión se obtuvo un rendimiento del 33.16%, debido a que parte de la capsaicina quedó retenida en el cartucho Envicarb.

Un nuevo ensayo con 15 mL de Acetato de etilo (100%) como segunda fase móvil eluyó la capsaicina retenida en el cartucho Envicarb, recuperándose casi la totalidad de ella. El rendimiento fue 37.45%.

Los resultados obtenidos en cada uno de los diferentes procesos descritos, están ilustrados en la Tabla 23 en el anexo II.

Por último se realizó un ensayo similar al descrito anteriormente, pero en lugar de la solución acuosa de NaOH se usó una solución acuosa de NH_4OH , base más débil, que no promueve la formación de óxido de plata, permitiendo la presencia

del ión plata, necesaria para el acomplejamiento con la capsaicina. El rendimiento promedio en este caso fue de 48.62%.

Finalmente, no se pudo determinar el porcentaje de recuperación por el deterioro de la lámpara de detección de UV-Vis del equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que registra 1672.84 horas adicionales de uso con relación al tiempo máximo de vida útil de la lámpara UV-Vis de 1000 horas, suministrado por la casa comercial *Khymos*. Igualmente, el puerto de inyección se encontraba taponado. La inestabilidad de la lámpara se confirmó realizando de nuevo la curva de calibración que es reportada en el apartado 2.3.2 de la metodología de estandarización del método analítico. Los resultados obtenidos se registran en la Tabla17.

Tabla 17. Áreas de la curva de calibración de Capsaicina.

A				B				% de pérdida de Cap		
[Cap] (ppm)	Áreas (mAU)	Área Prom (mAU)	s	RSD (%)	[Cap] (ppm)	Áreas (mAU)	Área Prom (mAU)		s	RSD (%)
	20.9					13.0				
0.6	20.7	20.80	0.10	0.48	0.6	15.6	13.73	1.62	11.86	33.98
	20.8					12.6				
	31.8					23.0				
0.9	31.5	31.53	0.25	0.79	0.9	11.5	18.86	6.39	33.89	40.16
	31.3					22.1				
	42.1					30.1				
1.2	42.3	42.23	0.12	0.79	1.2	26.2	28.66	2.14	7.48	32.12
	42.3					29.7				
	53.5					31.6				
1.5	53.3	53.30	0.20	0.80	1.5	39.7	32.13	7.31	22.76	39.71
	53.1					25.1				
	64.8					43.6				
1.8	64.3	64.47	0.29	0.80	1.8	45.4	42.60	3.41	8.01	33.92
	64.3					38.8				
	71.9					36.4				
2.0	71.3	71.70	0.35	0.80	2.0	40.5	35.40	5.66	16.01	50.63
	71.9					29.3				

A: Sistema con volumen de inyección =20 µL, y límite de horas de lámpara Uv-vis <1000 h, B Sistema con volumen de inyección <20 µL, y límite de horas de lámpara Uv-vis >1000 h. ¹Porcentaje obtenido con la siguiente formula: [(área promedio con B / área promedio con A) x100%]

En la tabla anterior se observa claramente la deficiente repetitividad de los resultados presentados cuando se analizan las soluciones patrón de capsaicina con el sistema B, es decir, cuando la lámpara ha sobrepasado el tiempo de vida útil. Los valores de las desviaciones estándar relativas (RSD) para el sistema B, en el rango de concentraciones de 0.6 a 2.0 ppm de capsaicina, evidencian una pobre precisión, debido a que los valores encontrados son mayores al 7%, cuando analíticamente estos deben ser menores al 2% para que el método sea confiable cuando se realiza un triplicado²⁷.

De acuerdo a los altos valores de RDS encontrados cuando la lámpara sobrepasó el tiempo de vida útil, además, de un porcentaje de pérdida aproximado oscila entre una 30 y un 50% en términos de área de cada estándar inyectado por triplicado es posible deducir que no existen condiciones adecuadas para la cuantificación de capsaicina en el equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Adicionalmente, se realizó un ensayo para corroborar la estabilidad de la lámpara midiendo la variabilidad de las áreas en el mismo día con un estándar de concentración de 0.5 ppm de capsaicina, el cual, no se degrada a la temperatura ambiente y/o presencia de luz. Éste estándar se analizó por HPLC cada 3 horas. Los resultados que se observan en la Tabla 18, muestran que no hay estabilidad en la medida e incoherencia en la misma ya que ésta aumenta y disminuye la medida de área con el tiempo sin alguna razón justificable. Adicionalmente, las desviaciones estándar relativas reportadas están por encima de 1% lo que ratifica que el método de cuantificación no es confiable y por lo tanto no es posible realizar ningún proceso de cuantificación hasta que se realice el cambio de la lámpara de detección y el respectivo mantenimiento del puerto de inyección.

Tabla 18. Prueba de estabilidad de la lámpara y puerto de inyección un patrón de Capsaicina 0.5 ppm

Tiempo de medida (h)	Área 1 (mUA)	Área 2 (mUA)	Área 3 (mUA)	Área promedio (mUA)	s	RSD (%)
0	13.0	13.4	12.8	13.07	0,34	2.34
3	7.94	6.92	6.5	7.12	0,74	10.40
6	4.87	3.92	4.68	4.49	0,50	11.20

4. CONCLUSIONES

- ❖ El procedimiento desarrollado en esta investigación para el aislamiento y purificación de la capsaicina mediante cromatografía con cartucho de carbón grafitizado – Envicarb, acomplejamiento del eluato con nitrato de plata amoniacal y extracciones líquido-líquido, resultó ser un método eficaz susceptible de optimización, debido a que hubo pérdida de capsaicina en cada extracción líquido-líquido.
- ❖ A pesar que el máximo rendimiento de extracción de oleorresina por metodología soxhlet se consiguió después de 12 h con etanol, el máximo rendimiento de la extracción de capsaicina se consiguió después del mismo tiempo por la metodología soxhlet - hexano.
- ❖ El cartucho de Envicarb, con hexano como eluente, presentó buena retención de colorantes por lo cual se empleó para complementar el procedimiento de purificación de la capsaicina. La purificación únicamente por cromatografía, con C18, óxido de Magnesio o Envicarb, no proporcionó buenos resultados para el aislamiento de capsaicina.
- ❖ Se estandarizó el método de identificación y cuantificación capsaicina por HPLC, en tiempos de corrida cortos, buena resolución y definición de los picos. El procedimiento empleado es altamente confiable por su precisión, sensibilidad y linealidad alcanzadas.
- ❖ El porcentaje de recuperación no se pudo reportar, debido a que el equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), no se encontraba en óptimas condiciones. Esto se confirmó mediante una curva de calibración,

encontrándose que las desviaciones estándar relativas fueron muy superiores a los valores permitidos.

BIBLIOGRAFIA

-
- 1 ROCABADO, F. Análisis de la cadena de valor agro-alimentaría del ají: Fundación para el desarrollo de tecnologías agropecuarias valles. Cochabamba, Bolivia. 2001. [Citado en Septiembre de 2001]. Disponible en Internet: <URL:<http://www.fdto-valles.org/Pages/Publica.html>>.
 - 2 FEDERACIÓN NACIONAL DE CAFETEROS. El cultivo del Pimentón. 7 ed. Bogotá: Linotipia Bolívar, 1994. p. 3 – 5.
 - 3 BOSLAND, P. Chiles: a diverse crop. En: Hort Technol. Vol. 2. (1992). p. 6-10.
 - 4 FERNANDEZ TRUJILLO, J. Pablo; Extracción convencional de oleorresina de pimentón dulce y picante I. Generalidades, composición, proceso e innovaciones y aplicaciones; GRASAS Y ACEITES, Vol. 58 N°3, (2007); p. 252-263
 - 5 BOSLAND, P. Capsicums: Innovative uses of an ancient crop; J. Janick (ed.), Progress in new crops. En: ASHS Press, Arlington, (1996). p. 479-487.
 - 6 COLONIA C. El Cultivo del ají Cayenne (*Capsicum annuum*), una alternativa para agricultores del Valle del Cauca. En: Cultivo. (1999); p.13-24
 - 7 CONTRERAS-PADILLA M and YAHIA M.. Changes in capsaicinoids during development, maturation, and senescence of Chile peppers and relation with peroxidase activity. J. Agric. Food Chem. Vol. 46. (1998); p. 2075-2079.

-
- 8 JARÉN-GALÁN M; NIENABER U and SCHWARTZ S; Paprika (*Capsicum annuum*) Oleoresin Extraction with Supercritical Carbon Dioxide. En: Journal Agric. Food Chemical. Vol 4. (1999); p. 3558-3564
- 9 OROZCO M. Extracción y cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución (hplc) de los colorantes naturales del fruto del ají (*capsicum spp*): capsantina y capsorubina. Popayán, 2006, p. 40-42. Trabajo de grado (Químico). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Extractas y de la Educación. Departamento de Química
- 10 SCHWEIGGERT, U; CARLE, R; and SHIEBER, A. Characterization of major and minor capsaicinoids and related compounds in chili pods (*Capsicum frutescens* L.) by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. En: Analytica Chimica Acta. Vol. 557, 2006; p. 236-244
- 11 BATCHELOR, J. and JONES, B. Determination of the Scoville Heat Valou for Hot sauces and Chiles: an HPLC experimental; En: Journal Of Chemical Education. Vol. 77, N° 2 (February 2000); p. 266-267
- 12 ZARC INTERNATIONAL, INC. Products OP CAP-STUN, Capsaicinoides. 1999
- 13 WALPOLE, C. et al. Analogues of Capsaicin with Agonist Activity as Novel Analgesic Agents; Structure – Activity Studies. 1. The Aromatic “A – Region”. En: Journal of Medical Chemistry. Vol.36, No. 16 (1993); p. 2352 – 2372
- 14 ALPIZAR I.; TRUJILLO A. y HERRERA F. Determinación de capsaicinoides en Chile Habanero (*Capsicum chinense Jaq*) colectado en Yucatàn; En:

Proceedings of the international pepper conference. (16th: 2002: Tampico, Tamaulipas, Mexico)

- 15 CHING-WEN CHEN, SHO TONE LEE, WEN TUNG WU, WEN-MEI FU, FENG-MING HO and WAN WAN LIN Signal transduction for inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 induction by capsaicin and related analogs in macrophages; *British Journal of Pharmacology* (2003); p. 140, 1077–1087
- 16 MATUCCI-CERINIC, M. et al. Effects of capsaicin on the metabolism of rheumatoid arthritis synoviocytes in vitro. En: *Annals of the Rheumatic Diseases*. Vol. 49; (1990);p. 598-602
- 17 TOPUZ, A and OZDEMIR, F. Assessment of carotenoids, capsaicinoids and ascorbic acid composition of some selected pepper cultivars (*Capsicum annum* L.) grown in Turkey. En: *Journal of Food Composition and Analysis* Vol. 20 (2007); p. 596–602
- 18 SANCHEZ, A. et al. Induction of apoptosis in prostate tumor PC-3 cells and inhibition of xenograft prostate tumor growth by the vanilloid capsaicin. *Apoptosis*. 2006 Jan;11(1):89-99.
- 19 STERNER, R. and AMES, K. Persistence of capsicum oleoresin in soil. EN: *International Biodeterioration & Biodegradation* Vol. 49 (2002) P. 145-149.
- 20 SANTAMARÍA, R. et al. Selective enzyme-mediated extracción of capsaicinoids and Carotenoids from Chili Guajillo Puya (*Capsicum annum* L.) usando etanol

-
- as solvent. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol.48, N°7 (2000); p. 3063-3067
- 21 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-glicosidos. Popayán, 2004. Trabajo de grado (Químico). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Extractas y de la Educación. Departamento de Química.
- 22 BARBERO, G. et al. Ultrasound-assited extraction of capsaicinoides from peppers. En: Talanta Vol.8 (2008) p. 1256-1259
- 23 BARBERO, G; PALMA, M and BARROSO, C. Determination of capsaicinoids in peppers by microwave-assisted extraction-high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. En: Analytica Chica Acta. Vol. 578. (2006); p. 227-233
- 24 SATO, K. et al. Direct connection of supercritical fluid extraction and supercritical fluid chromatography as a rapad quantitative method for capsaicinoids in placentas of *Capsicum*. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol.47, N°11 (1999); p. 4665-4667
- 25 CHEN, W. et al. Preparation and purification of synthetic capsaicin. United States Patent, Pub. N° US 2005/0085652A1; (Apr. 21, 2005)
- 26 HISASHI, S. et al. Method for industrial purification of capsaicin. United States Patent, Pub. N° US 1999/005955631A; (Sep.21, 1999)

-
- 27 QUATTROCCHI, O; ALBELAIRA DE ANDRIXI, S; LABA R.; Introducción a la HPLC, Aplicación y Práctica.; Artes Gráficas Farro S.A; Buenos Aires, Argentina 1992, p. 301-327
- 28 TUCKER S. et al.; Determination of capsaicin and dihidrocapsaicin in air in a pickle and pepper processing plant. En: AIHJ Vol. 62 (2001); p. 45-48
- 29 THOMAS, B; SCHEIBER, A. And WEISSKOPF C. Simple method for quantitation of capsaicinoids in peppers using capillary gas chromatography. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol.46, N°7 (1998); p. 2655-2663
- 30 PINO, J. et al. Characterization of total capsaicinoids, color and volatile compounds of habanero chilli pepper (*Capsicum chinense* Jack.) cultivars grown in Yucatan. En: Food Chemistry Vol. 104 (2007); p. 1682-1686
- 31 SOUSA, E. et al. Multivariate optimization and HS-SPME/GC-MS analysis of VOCs in red, yellow and purple varieties of *Capsicum chinense* sp. Peppers. En: Microchemical Journal Vol. 82 (2006); p. 142-149
- 32 THOMPSON, R. et al. Isolation of individual capsaicinoids from a mixture and their characterization by ¹³C NMR spectrometry. En: Talanta Vol. 70 (2006) p. 315-322
- 33 MILLER .C; MILLER J.N; Estadística para química analítica; Ed. Segunda, Addison-Wesley iberoamericana S.A, Estados Unidos, 1993, p. 93-105

-
- 34 CÉZAR Ana., et al. Pimiento para pimentón en Santa María: Alternativas de Riego: Dirección Provincial de Programación del Desarrollo Ministerio de Producción y Desarrollo Gobierno de la Provincia de Catamarca, Catamarca 2006. [Citado en Octubre de 2006]. Disponible en Internet:<http://www.produccioncatamarca.gov.ar/Publicaciones/files/11%20Pimiento%20para%20pimenton%20en%20Santa%20Maria%20Alternativas%20de%20riego.pdf>>
- 35 MORRISON, R y BOYD, R. Química orgánica. Ed. Quinta. Pearson education, Addison-Wesley iberoamericana S.A, México,1998. p. 226-228
- 36 COATES.G; GREEN, M; WADE. K; Principios de química organometálica; Editorial Reverté, S.A; Barcelona, España, 1975, p. 203-226
- 37 SAX, I. y LEWIS, R. Diccionario de química y de productos químicos. Editorial Omega, S.A; Barcelona, 1993. p. 667

ANEXOS

ANEXO I

Luego de haber acondicionado los parámetros óptimos de trabajo en el equipo de cromatografía de alta resolución (HPLC), se requirió observar el comportamiento del método analítico.

LINEALIDAD

Se elaboraron seis disoluciones a partir de un patrón estándar de capsaicina, 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 (A), y así poder determinar la linealidad dentro de un rango específico.

$$Y = bX + a \quad (A)$$

Donde **Y** representa el área bajo la curva del pico característico del analito, **X** la concentración del analito, **b** es la pendiente y **a** es el intercepto con el eje y. el coeficiente de correlación, **r**, de dicha curva se determinó por medio en esta ecuación.

El coeficiente de correlación, la pendiente y el intercepto con el eje y, se hallaron por medio de las ecuaciones B, C y D, teniendo en cuenta que cada disolución de concentración (ppm), **X_i**, fue analizada por triplicado por HPLC, obteniéndose áreas bajo la curva (mAU), **Y_i**.

$$b = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}} \quad (B)$$

$$a = \frac{\sum Y_i - b \sum X_i}{n}$$

(C)

$$r = \frac{(\sum X_i \times Y_i) - \left[\frac{\sum X_i \times \sum Y_i}{n} \right]}{\sqrt{\left[\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n} \right] \left[\sum Y_i^2 - \frac{(\sum Y_i)^2}{n} \right]}}$$

(D)

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

PRECISIÓN

Para describir la precisión de un conjunto de datos repetidos se utilizaron tres términos muy conocidos: la desviación estándar y la desviación estándar relativa, debido a que éste parámetro analítico está relacionado con la concordancia de los resultados Este término se utilizó para describir qué tan reproducible y repetitivas eran las mediciones.

Desviación estándar: **S**

Es una medida de la precisión o dispersión de una población de datos, y está dada por la ecuación E:

$$S = \sqrt{\frac{[\sum_{i=1}^n X_i (X_i - \bar{X})]}{n - 1}}$$

(E)

Donde n es el número de medidas, X_i es el valor de la concentración medida y \bar{X} el estimador de la media poblacional, es decir es la suma de las mediciones, divididas entre el número de mediciones que se realizaron.

$$\bar{X} = \sum_{i=1}^n \frac{X_i}{n}$$

(F)

Desviación estándar relativa: RSD

Es el porcentaje de la desviación estándar y permitió evaluar la incertidumbre en la estimación de la media.

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

(G)

SENSIBILIDAD

La mínima cantidad de analito (capsaicina) que puede producir un resultado significativo por el método analítico establecido, está relacionada con la sensibilidad. Para realizar un estimativo de esta medida, fue necesario evaluar los límites de detención y cuantificación, los cuales se estimaron a partir de la curva de regresión considerando concentraciones bajas de capsaicina.

Límite de detención (LD)

Se puede describir como aquella concentración de un analito que proporciona una señal en el instrumento (y) significativamente diferente de la señal de una muestra en “blanco” o “señal de fondo”. También es comúnmente definida como la cantidad de concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco, y_B , más dos veces la desviación estándar del blanco S_B .

Para encontrar el valor de LD, primero se determinó la pendiente b empleando la ecuación (B). Luego se obtuvo otra curva de calibración, inyectando cada punto

por triplicado pero en este caso las menores concentraciones de capsaicina, determinándose la ecuación de esta nueva recta de calibración y se extrapoló la respuesta a concentración cero, obteniéndose un estimado de la respuesta del blanco, y_B mediante la ecuación H, y el estimado de la desviación estándar del blanco S_B utilizando la ecuación I.

$$y_B = b(0) + a \quad (H)$$

$$S_B = \sqrt{\frac{S_{xy}^2}{\left[\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}\right]}} \quad (I)$$

Donde S_{xy}^2 está dado por la ecuación J.

$$S_{xy}^2 = \frac{\sum Y_i^2 - a(\sum Y_i) - b(\sum X_i Y_i)}{n - 2} \quad (J)$$

Con estos datos se puede determinar el límite de detección del método analítico.

$$\text{Límite de Detección} = \frac{y_{LD} - y_B}{b} \quad (K)$$

Donde y_{LD} está dado por la ecuación matemática:

$$y_{LD} = y_B + 3S_B \quad (L)$$

Límite de cuantificación (LC)

La menor concentración del analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas, está representada por el límite de cuantificación. Valor que fue hallado de manera similar a LD, utilizando las ecuaciones 8, 9 y 10, y además empleando las ecuaciones K y L.

$$y_{LC} = y_B + 10S_B \quad (M)$$

$$\text{Límite de Cuantificación} = \frac{y_{LC} - y_B}{b} \quad (N)$$

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:

$$t_{cal} = \frac{|100-R|}{RSD * \sqrt{n}} \quad (O)$$

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

ANEXO II

Tabla 1. Cantidad de capsaicina contenida en la oleorresina obtenida por metodología soxhlet utilizando diferentes solventes capsaicina (en mg por 100 g de fruto seco)

Tiempo de extracción (h)	Peso de Capsaicina		
	ETANOL	HEXANO	ACETONA
3	11.47	39.53	10.47
6	11.79	163.81	23.51
9	13.10	222.06	29.54
12	14.01	274.27	33.27
15	13.87	271.97	30.10
18	13.44	269.94	29.39

Tabla 2. Cantidad de capsaicina contenida en la oleorresina obtenida por metodología soxhlet capsaicina (en mg por 100 g de fruto seco).

Tiempo de Extracción (h)	Peso de capsaicina
9	227.98
10	255.89
11	258.06
12	275.18
13	274.93
14	266.85

Tabla 3. Cantidad de capsaicina (en mg por 100 g de fruto seco). Contenida en la oleorresina obtenida por metodología percolación.

Tiempo de Extracción (h)	Peso de capsaicina
3	0.73
6	1.21
9	1.61
12	1.98
15	2.32
18	2.55

h

Tabla 4. Cantidad de capsaicina extraída por metodología percolación y soxhlet capsaicina (en mg por 100 g de fruto seco)

Tiempo de extracción (h)	Peso de Cap por Percolación	Peso de Cap por Soxhlet
3	0.73	39.53
6	1.21	163.81
9	1.61	222.06
12	1.98	274.27
15	2.32	271.97
18	2.55	269.94

Tabla 5. . Peso de capsaicina en mg por 100 g de fruto seco, antes y después del proceso Envicarb –Plata. y porcentaje de rendimiento de la purificación

		ENSAYOS							
ETAPAS	I		II		III		IV		
	Peso	%	Peso	%	Peso	%	Peso	%	
	A	90.09		209.77		215.76		273.75	
B	-		-		214.64		272.41		
C	23.32	25.88	67.62	32.23	71.54	33.16	102.52	37.45	

A: antes de la extracción. **B:** después de la extracción. **C:** peso de capsaicina y rendimiento después del procedimiento de purificación.

