

UNIVERSIDAD DE CÁDIZ
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



TESIS DOCTORAL

**EXTRACCIÓN, ANÁLISIS, ESTABILIDAD Y SÍNTESIS DE
CAPSAICINOIDES**

Gerardo Fernández Barbero

Cádiz, Julio 2007

MEMORIA PRESENTADA POR EL LICENCIADO
GERARDO FERNÁNDEZ BARBERO
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIA Y
TECNOLOGÍA QUÍMICA

Fdo.: Gerardo Fernández Barbero

Dr. D. Carmelo García Barroso y Dr. D. Miguel Palma Lovillo, Profesores del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz

HACEN CONSTAR:

Que el presente trabajo de investigación titulado: **“Extracción, análisis, estabilidad y síntesis de capsaicinoides”**, ha sido realizado bajo su dirección por D. Gerardo Fernández Barbero para optar al grado de Doctor en Ciencia y Tecnología Química por la Universidad de Cádiz.

Y para que conste, expiden y firman la presente certificación
En Puerto Real, a 23 de noviembre de 2006

Fdo.: Dr. D. Carmelo García Barroso

Fdo.: Dr. D. Miguel Palma Lovillo

Dr. D. José Luis Hidalgo Hidalgo de Cisneros, Profesor de Química Analítica y Director del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz

HACE CONSTAR:

Que el presente trabajo de investigación titulado **“Extracción, análisis, estabilidad y síntesis de capsaicinoides”**, constituye la memoria que presenta D. Gerardo Fernández Barbero para optar al grado de Doctor en Ciencias y Tecnología Química por la Universidad de Cádiz, habiéndose realizado la investigación en el Departamento de Química Analítica de esta Universidad bajo la dirección de los profesores Dr. D. Carmelo García Barroso y Dr. D. Miguel Palma Lovillo.

Y para que conste, expido y firmo la presente certificación
En Puerto Real, a 23 de noviembre de 2006

Fdo.: Dr. D. José Luís Hidalgo Hidalgo de Cisneros

I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.

I. 1. Pimientos.	3
I. 1. 1. Características generales.	3
I. 1. 2. Aspectos botánicos.	4
I. 1. 3. Cultivo del pimiento.	6
I. 1. 3. 1. Importancia económica.	6
I. 1. 3. 2. Requerimientos para la plantación.	8
I. 1. 4. Compuestos presentes en los pimientos.	10
I. 1. 5. Propiedades dietéticas.	12
I. 2. Productos elaborados a partir de pimientos.	13
I. 2. 1. Pimentón.	16
I. 2. 2. Conservas de pimientos.	19
I. 2. 3. Oleorresina.	22
I. 2. 4. Salsas y condimentos picantes.	23
I. 3. Capsaicinoides.	25
I. 3. 1. Características generales.	25
I. 3. 2. Efectos y aplicaciones de los capsaicinoides.	28
I. 3. 3. Evolución en el contenido en capsaicinoides durante la maduración y localización en la placenta.	32
I. 4. Capsinoides.	37
I. 4. 1. Características generales.	37
I. 4. 2. Efectos y aplicaciones de los capsinoides.	39
I. 5. Análisis de capsaicinoides en pimientos.	44
I. 5. 1. Técnicas de extracción de capsaicinoides en pimientos.	44
I. 5. 1. 1. Extracción empleando maceración-agitación de la muestra.	48
I. 5. 1. 1. Empleo de enzimas durante la extracción.	49
I. 5. 1. 3. Extracción Soxhlet.	49
I. 5. 1. 4. Extracción asistida por ultrasonidos (EAU).	50
I. 5. 1. 5. Extracción mediante fluidos presurizados.	55
I. 5. 1. 6. Extracción asistida por microondas.	58
I. 5. 1. 7. Extracción mediante fluidos supercríticos.	63
I. 5. 2. Métodos de separación y análisis de capsaicinoides.	67
I. 5. 2. 1. Cromatografía en capa fina.	67
I. 5. 2. 2. Cromatografía de gases (CG).	68
I. 5. 2. 3. Cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE).	70
I. 5. 2. 4. Extracción con fluidos supercríticos acoplada a cromatografía de fluidos supercríticos (EFS/CFS).	76

I. 5. 3. Métodos de identificación y cuantificación de capsaicinoides.	77
I. 5. 3. 1. Espectrometría de absorción ultravioleta-visible.	77
I. 5. 3. 2. Espectrometría de fluorescencia.	78
I. 5. 3. 3. Espectrometría de masas.	80
I. 5. 3. 4. Espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano	82
I. 6. Síntesis de capsaicinoides y de capsinoides.	84
I. 6. 1. Síntesis de capsaicinoides.	84
I. 6. 2. Síntesis de capsinoides.	88
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.	93
III. MATERIALES Y MÉTODOS.	
III. 1. Reactivos disolventes y sustancias patrones.	97
III. 2. Método de preparación y almacenamiento de muestras de pimientos.	99
III. 3. Aparatos e instrumentos.	100
III. 3. 1. Técnicas de extracción.	100
III. 3. 2. Técnicas cromatográficas.	105
III. 3. 3. Espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS).	109
III. 3. 4. Resonancia magnética nuclear (RMN).	110
III. 3. 5. Otros equipos y materiales.	111
III. 4. Identificación de capsaicinoides.	112
III. 4. 1. Espectroscopia UV-Vis.	112
III. 4. 2. Espectrometría de masas.	113
III. 4. 3. Resonancia magnética nuclear.	114
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	
IV. 1. Desarrollo de métodos cromatográficos para la separación y cuantificación de capsaicinoides en pimientos.	117
IV. 1. 1. Desarrollo de un método de análisis de capsaicinoides en pimientos mediante el empleo de la cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa con una columna C-18 convencional.	118
IV. 1. 1. 1. Introducción.	118
IV. 1. 1. 2. Materiales y métodos.	119
IV. 1. 1. 3. Resultados y discusión.	121
IV. 1. 1. 4. Robustez del método.	125
IV. 1. 1. 5. Conclusiones.	129

IV. 1. 2. Desarrollo de un método de análisis de capsaicinoides en pimientos mediante el empleo de la cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa con una columna monolítica.	130
IV. 1. 2. 1. Introducción.	130
IV. 1. 2. 2. Materiales y métodos.	131
IV. 1. 2. 3. Resultados y discusión.	133
IV. 1. 2. 4. Robustez del método.	137
IV. 1. 2. 5. Conclusiones.	141
IV. 1. 3. Comparación de los métodos desarrollados con la columna C-18 convencional y con la columna monolítica.	142
IV. 1. 3. 1. Comparación.	143
IV. 1. 3. 2. Conclusiones.	145
IV. 2. Desarrollo de métodos de extracción de capsaicinoides en pimientos.	147
IV. 2. 1. Extracción asistida por ultrasonidos de capsaicinoides en pimientos.	148
IV. 2. 1. 1. Introducción.	148
IV. 2. 1. 2. Materiales y métodos.	149
IV. 2. 1. 3. Resultados y discusión.	150
IV. 2. 1. 4. Conclusiones.	157
IV. 2. 2. Extracción mediante fluidos presurizados de capsaicinoides en pimientos.	158
IV. 2. 2. 1. Introducción.	158
IV. 2. 2. 2. Materiales y métodos.	159
IV. 2. 2. 3. Resultados y discusión.	160
IV. 2. 2. 4. Conclusiones.	164
IV. 2. 3. Extracción asistida por microondas de capsaicinoides en pimientos.	165
IV. 2. 3. 1. Introducción.	165
IV. 2. 3. 2. Materiales y métodos.	166
IV. 2. 3. 3. Resultados y discusión.	167
IV. 2. 3. 4. Conclusiones.	173
IV. 2. 4. Estudio comparativo entre los métodos de extracción desarrollados.	174
IV. 2. 4. 1. Comparación de los métodos de extracción desarrollados.	175
IV. 2. 4. 2. Conclusiones.	177

IV. 3. Síntesis de capsaicinoides y capsinoides. Estudio de la relación cuantitativa estructura-actividad.	179
IV. 3. 1. Síntesis de capsaicinoides.	180
IV. 3. 1. 1. Introducción.	180
IV. 3. 1. 2. Metodología de síntesis de capsaicinoides.	181
IV. 3. 2. Síntesis de capsinoides.	191
IV. 3. 2. 1. Introducción.	191
IV. 3. 2. 2. Metodología de síntesis de capsinoides.	192
IV. 3. 2. 3. Síntesis del capsiato.	214
IV. 3. 3. Desarrollo de métodos cromatográficos para la separación de capsaicinoides y capsinoides.	220
IV. 3. 3. 1. Separación de capsaicinoides.	221
IV. 3. 3. 1. 1. Separación de capsaicinoides mediante el empleo de la columna C-18.	221
IV. 3. 3. 1. 2. Separación de capsaicinoides mediante el empleo de la columna monolítica.	222
IV. 3. 3. 2. Separación de capsinoides.	224
IV. 3. 3. 2. 1. Separación de capsinoides mediante el empleo de la columna C-18.	224
IV. 3. 3. 2. 2. Separación de capsinoides mediante el empleo de la columna monolítica.	226
IV. 3. 3. 3. Conclusiones.	227
IV. 3. 4. Estudio de la relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR).	228
IV. 3. 4. 1. Regla de los cinco de Lipinsky.	229
IV. 3. 4. 2. El coeficiente de partición octanol-agua (P).	230
IV. 3. 4. 3. Bioensayos.	233
IV. 3. 4. 4. Discusión de los resultados: análisis de la relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR).	235
IV. 3. 4. 4. 1. Análisis de la relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR) para Capsaicinoides.	236
IV. 3. 4. 4. 2. Análisis de la relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR) para Capsinoides.	239
IV. 3. 4. 5. Conclusiones.	241
IV. 4. Aplicación de las técnicas analíticas desarrolladas para la cuantificación de capsaicinoides en pimientos y alimentos.	243
IV. 4. 1. Estudio de la evolución del contenido en capsaicinoides en pimientos a lo largo de la maduración del fruto.	244
IV. 4. 1. 1. Cultivo de los pimientos.	244
IV. 4. 1. 2. Metodología empleada para el estudio.	246

IV. 4. 1. 3. Pimiento Extra Picante (<i>Capsicum annuum</i>).	247
IV. 4. 1. 3. 1. Pimiento Extra Picante (pericarpio).	247
IV. 4. 1. 3. 2. Pimiento Extra Picante (placenta).	251
IV. 4. 1. 4. Pimiento Bolilla (<i>Capsicum annuum</i>).	255
IV. 4. 1. 4. 1. Pimiento Bolilla (pericarpio).	256
IV. 4. 1. 4. 2. Pimiento Bolilla (placenta).	259
IV. 4. 1. 5. Comparación de la cantidad de capsaicinoides totales entre el pimiento Extra Picante y el pimiento Bolilla.	264
IV. 4. 1. 6. Pimiento Cayena (<i>Capsicum frutescens</i>).	268
IV. 4. 1. 7. Cuantificación total de capsaicinoides mediante la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano.	270
IV. 4. 1. 8. Conclusiones.	273
IV. 4. 2. Estudio del contenido en capsaicinoides de variedades de pimientos cultivadas en España.	275
IV. 4. 2. 1. Introducción.	275
IV. 4. 2. 2. Procedimiento experimental.	275
IV. 4. 2. 3. Resultados.	277
IV. 4. 3. Estudio del contenido en capsaicinoides de alimentos elaborados a partir de pimientos picantes.	279
IV. 4. 3. 1. Introducción.	279
IV. 4. 3. 2. Procedimiento experimental.	280
IV. 4. 3. 3. Resultados.	282
IV. 4. 3. 4. Conclusiones.	285
V. CONCLUSIONES.	289
VI. ANEXOS.	293
VI. 1. Espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de capsaicinoides.	
VI. 2. Espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de capsinoides.	
VI. 3. Espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de la síntesis del capsiato.	

I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.

I. 1. PIMIENTOS.

I. 1. 1. Características generales.

El pimiento es originario de América del Sur, de la zona de Bolivia y Perú. Cristóbal Colón introdujo el pimiento en España en 1493 tras su primer viaje, procedente de Haití. Al igual que otras especies hortícolas, rápidamente se incorporó al elenco de los productos saborizantes y de las hortalizas del Viejo Mundo, siendo principalmente cultivado en la actualidad en regiones áridas y secas del sur de Europa, América Central, la India y Asia Central. De hecho, en la actualidad casi la mitad del pimiento del mundo se produce en el área del Mediterráneo. Forma parte de las hortalizas cultivadas en casi todos los lugares del mundo y en España es una de las que ha tenido resultados más favorables durante los últimos años.

Su introducción en Europa supuso un avance culinario, ya que vino a complementar e incluso sustituir a otro condimento muy empleado como era la pimienta negra (*Piper nigrum* L.), de gran importancia comercial entre Oriente y Occidente.

Los pimientos, respecto a su clasificación científica, son frutos de las plantas pertenecientes a las especies y variedades del género *Capsicum*, de la familia *Solanaceae* (al igual que el tomate, la patata, el tabaco o la berenjena). Posee una gran variabilidad genética que lleva a que existan varias posturas con respecto a su denominación botánica. Sin embargo, la mayoría de los autores aceptan que es el *Capsicum annuum* la especie que engloba a casi todas las variedades cultivadas.¹

El género *Capsicum* incluye 23 especies reconocidas, de las cuales sólo 5 son cultivadas: *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. frutescens*, *C. pubescens* y *C. chinense*. *Capsicum annuum* es la especie más importante y difundida, sobre la que hay mayores trabajos de mejora genética.²

El fruto de esta planta ha sido y es usado ampliamente por todo el mundo, bien como alimento, como especia, por su sabor, aroma y color, o como medicina, por sus marcadas propiedades curativas de determinadas afecciones.

También hay que citar la función decorativa de los llamados “pimientos o guindillas ornamentales”. La mayoría de estos pimientos ornamentales son de color rojo o naranja, pero también se ofrecen variedades blancas, amarillas y moradas.

Gran parte de la demanda de los pimientos en todo el mundo, principalmente en la zona de América Central y América del Sur, es debida al sabor picante que presentan muchas variedades de pimientos y que es debido a la presencia de capsaicinoides. Los

¹ J. Jurenitsch, W. Kubelka, K. Jentzsch. “Identification of cultivated Taxa of *Capsicum* taxonomy, anatomy and composition of pungent principles”. *Planta Medica*, 35 (2): 174-181, 1979.

² V.S. Govindarajan. “*Capsicum* production, technology, and quality. Part II. Processed product, Standard, world production and trade”. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, 24: 207-288, 1986.

pimientos que se comercializan para el consumo, se pueden clasificar en tres categorías en función de sus propiedades picantes:

- a) Las variedades cuyo sabor es muy picante, con un contenido en capsaicinoides entre el 0,3 y el 1 % en peso seco del pimiento. La producción y el comercio de estas variedades se lleva a cabo en cantidades relativamente poco importantes, aunque estas variedades son las que alcanzan los mejores precios y son demandadas por su fuerte sabor picante.
- b) Las variedades cuyo sabor es picante, con un contenido en capsaicinoides entre 0,01 y 0,3 % en peso seco del pimiento.
- c) Las variedades cuyo sabor es dulce o moderadamente picante, con un contenido en capsaicinoides inferior al 0,01 % en peso seco del pimiento. Son las que constituyen el mayor volumen del comercio internacional, y sus precios son los más bajos. Son de interés tanto por sus propiedades colorantes como por su sabor.

I. 1. 2. Aspectos botánicos.

La **planta** del pimiento es herbácea perenne, con ciclo de cultivo anual de porte variable entre los 0,5 metros (en determinadas variedades de cultivo al aire libre) y más de dos metros (en gran parte de los híbridos cultivados en invernadero).



Figura 1: *Planta del pimiento.*

El **sistema radicular** es pivotante y profundo (dependiendo de la profundidad y textura del suelo), con numerosas raíces adventicias que horizontalmente pueden alcanzar una longitud comprendida entre 50 centímetros y 1 metro.

El **tallo** principal es de crecimiento limitado y erecto. Aunque se le considera una planta herbácea, tiene la particularidad de tener tallo leñoso. Éste puede tener forma cilíndrica o prismática angular, glabro (liso y suave al tacto), erecto y con altura variable según la variedad. A partir de cierta altura “cruz” emite 2 o 3 ramificaciones (dependiendo de la variedad) y continúa ramificándose de forma dicotómica hasta el final de su ciclo. Los tallos secundarios se bifurcan después de brotar varias hojas, y así sucesivamente.

La **hoja** es simple, entera, lampiña y lanceolada, con un ápice muy pronunciado (acuminado) y un pecíolo largo y poco aparente. El haz es glabro y de color verde más o menos intenso (dependiendo de la variedad) y brillante. El nervio principal parte de la

base de la hoja, como una prolongación del pecíolo, del mismo modo que las nerviaciones secundarias que son pronunciadas y llegan casi al borde de la hoja. La inserción de las hojas en el tallo tiene lugar de forma alterna y su tamaño es variable en función de la variedad, existiendo cierta correlación entre el tamaño de la hoja adulta y el peso medio del fruto.

Las **flores** son actinomorfas, hermafroditas, con cáliz de 6 sépalos, pequeñas, con corola de color blanco verdusco o blanco amarillento y pedicelos generalmente múltiples, de 5 pétalos y 6 estambres insertos en la garganta de la corola. El estigma generalmente está al nivel de las anteras, lo que facilita la autopolinización. Aparecen solitarias en cada nudo del tallo, con inserción en las axilas de las hojas. La polinización es autógama, aunque puede presentarse un porcentaje de alogamia que no supera el 10 %.

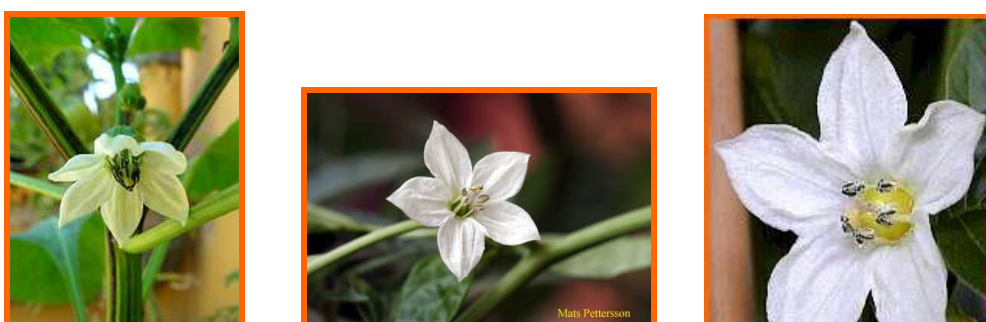


Figura 2: *Flor del pimiento.*

El **fruto** es una baya hueca, no jugosa, carnosa, semicartilaginosa y deprimida, que cuelga de la planta mediante un pedúnculo. El color del fruto es variable (verde, rojo, amarillo, naranja, violeta o blanco). Al llegar a la maduración los frutos son normalmente rojizos, aunque también los hay anaranjados y amarillos. Existe una diversidad de formas en los frutos (alargados, de 3 o 4 picos, cuadrados, achatados, etc.), pero generalmente se agrupan en alargados y redondeados. Su tamaño es variable, pudiendo pesar desde escasos gramos hasta más de 500 gramos. Los frutos son sabrosos y su sabor puede ser dulce o picante³. La dimensión no es un criterio muy seguro, pero en general, los frutos de menor tamaño son los que presentan un sabor picante más intenso.



Figura 3: *Diversos tipos de pimientos.*

³ J. Andrews. "Peppers: The domesticated capsicums". University of Texas Press, Austin, 1984.

Las **semillas** generalmente son redondeadas, ligeramente reniformes, lisas de coloración amarillenta o blanco amarillenta y longitud variable entre 3 y 5 milímetros. Se encuentran insertas en una placenta cónica de disposición central. El porcentaje de germinación es alto y puede mantenerse por 4 o 5 años bajo buenas condiciones de conservación.

Los pimientos son utilizados como una parte de la dieta por diferentes razones en muchas partes del mundo. Son consumidos como frutos frescos, en conservas, como constituyentes de condimentos y salsas, y como polvos secos (pimentón) usados como especias y condimentos. Los pimientos también han sido ampliamente utilizados en alimentación como colorantes y por sus propiedades picantes. Los pimientos picantes se utilizan como aditivos alimenticios y son muy valorados por sus atributos sensoriales del color, picor y aroma.⁴

I. 1. 3. Cultivo del pimiento.

I. 1. 3. 1. Importancia económica.

El éxito del pimiento radica en que es un cultivo con tres destinos de consumo: pimiento en fresco, para pimentón y para conserva.

La demanda de los mercados europeos de pimientos frescos durante todo el año, ha crecido espectacularmente y ha tenido como consecuencia el desarrollo del cultivo en invernaderos en todo el litoral mediterráneo español. El pimiento es uno de los cultivos hortícolas bajo invernadero con mayor superficie cultivada en nuestro país, localizándose casi la mitad de la producción en Almería, Alicante y Murcia.

Para hacerse una idea de la importancia económica de esta hortaliza a continuación se expone una tabla en la que viene recogida la producción de pimientos frescos en el año 2002 (toneladas) por países productores.⁵

⁴ V.S. Govindarajan, M.N. Sathyanarayana. "Capsicum production, technology, and quality. Part V. Impact on physiology, pharmacology, nutrition and metabolism; structure, pungency, pain, and desensitization sequences". Critical Review of Food Science and Nutrition, 29: 435-473, 1991.

⁵ Informe de la F.A.O. 2002.

Países	Producción pimientos frescos año 2002 (toneladas)
China	10.533.584
México	1.733.900
Turquía	1.500.000
España	989.600
Estados Unidos	885.630
Nigeria	715.000
Indonesia	550.000
Egipto	386.687
República de Corea	380.000
Italia	380.000
Países Bajos	290.000
Túnez	244.000
Bulgaria	205.000
Rumania	185.000
Marruecos	180.000
Argelia	175.000
Japón	159.300
Rep. Fed. Yugoslavia	135.100
Ucrania	125.000
Argentina	121.000
Grecia	110.000
Hungría	100.000
Rep. Islámica de Irán	100.000
Israel	99.970
Chile	62.000
Australia	50.000
India	50.000
Rep. Pop. Dem. Corea	55.000
Canadá	48.000

Tabla 1: *Producción de pimientos frescos en el año 2002 (toneladas) por países productores.*

I. 1. 3. 2. Requerimientos para la plantación.

El manejo racional de los factores climáticos (temperatura, humedad, luminosidad, etc.) de forma conjunta es fundamental para el funcionamiento adecuado del cultivo, ya que todos se encuentran estrechamente relacionados y la actuación sobre uno de éstos incide sobre el resto.

Temperatura:

La pimentera es una planta exigente respecto a la temperatura (más que el tomate y menos que la berenjena). La planta del pimiento procede de la zona meridional de América Tropical, por lo tanto es una planta bastante exigente en calor. En otoño e invierno, solo es posible criarlos en invernadero. A modo de ejemplo se expone la tabla 2 en la que aparecen las temperaturas críticas para el pimiento en las distintas fases de desarrollo.

FASES DEL CULTIVO	TEMPERATURA (°C)		
	ÓPTIMA	MÍNIMA	MÁXIMA
Germinación	20-25	13	40
Crecimiento vegetativo	20-25 (día)	15	32
	16-18 (noche)		
Floración y fructificación	26-28 (día)	18	35
	18-20 (noche)		

Tabla 2: Temperaturas críticas para el pimiento en las distintas fases de desarrollo.

A la vista de la tabla 2 se observa que las semillas de pimientos no germinan por debajo de 13 °C ni por encima de 40 °C. La planta del pimiento se hiel por debajo de los 0 °C y se detiene el crecimiento a 15 °C o menos.

El desarrollo óptimo de la planta se consigue a una temperatura diurna entre 20 y 25 °C y por la noche de 16 a 18 °C. La flor cuaja en fruto a una temperatura máxima de 35 °C, mínima de 18 °C y óptima de 25 °C.

Los saltos térmicos (diferencia de temperatura entre la máxima diurna y la mínima nocturna) ocasionan desequilibrios vegetativos. La coincidencia de bajas temperaturas durante el desarrollo del botón floral (entre 10 y 15 °C) da lugar a la formación de flores con alguna de las siguientes anomalías: pétalos curvados y sin desarrollar, formación de múltiples ovarios que pueden evolucionar a frutos distribuidos alrededor del principal, acortamiento de estambres y de pistilo, engrosamiento de ovario y pistilo, fusión de anteras, etc.

Las bajas temperaturas también inducen la formación de frutos de menor tamaño, que pueden presentar deformaciones, reducen la viabilidad del polen y favorecen la formación de frutos partenocárpicos. Las altas temperaturas provocan la caída de flores y frutitos.

Humedad:

En cuanto a la humedad, el pimiento se adapta bien a humedades relativas elevadas y por tanto a ambientes confinados de invernadero. La humedad relativa óptima oscila entre el 50 y el 70 %. Sin embargo, humedades relativas muy elevadas favorecen el desarrollo de enfermedades aéreas y dificultan la fecundación. La coincidencia de altas temperaturas y baja humedad relativa puede ocasionar la caída de flores y de frutos recién cuajados.

Luminosidad:

La pimentera es una planta muy exigente a la luz, sobre todo en los primeros estados de desarrollo y durante la floración. Los frutos son sensibles a los rayos directos del sol, por lo que se requiere que la planta tenga buena cobertura de hojas.

Suelo:

Los suelos más adecuados para el cultivo del pimiento son los franco-arenosos, profundos, ricos, con un contenido en materia orgánica del 3-4 % y principalmente bien drenados. Como se ha comentado, el pimiento necesita suelos ricos en materia orgánica, por tanto exige abundantes estercoladuras.

El cultivo del pimiento es exigente en cuanto a la uniformidad en la humedad del suelo durante toda su vida. Cuando están apareciendo las primeras flores interesa que no haya exceso de humedad en el suelo para evitar su caída por aborto de las mismas. El exceso de humedad en el suelo da lugar a follaje verde claro y pérdida de algunas plantas por asfixia de raíces.

La escasez de agua se manifiesta por el color verde oscuro y el abarquillamiento de las hojas. En casos de sequía los frutos toman un sabor más picante y si ésta es excesiva, llegan a caerse las flores.

Los valores de pH óptimos oscilan entre 6,5 y 7 aunque puede resistir ciertas condiciones de acidez (hasta un pH de 5,5); en suelos enarenados puede cultivarse con valores de pH próximos a 8. En cuanto al agua de riego el pH óptimo es de 5,5 a 7. Es una especie de moderada tolerancia a la salinidad tanto del suelo como del agua de riego, aunque en menor medida que el tomate.

El pimiento es una planta que no admite la competencia de malas hierbas, sobre todo en los primeros momentos, por lo tanto es necesario realizar las escardas en el momento oportuno.

En suelos con antecedentes de *Phytophthora* sp. es conveniente realizar una desinfección previa a la plantación. Además no es recomendable cultivar esta planta más de tres años en el mismo sitio, ni en terrenos donde hayan sido sembradas previamente otras plantas de la familia de las *Solanáceas* como tomates, berenjenas o patatas porque comparten las mismas enfermedades producidas por hongos del suelo.

I. 1. 4. Compuestos presentes en los pimientos.

Los pimientos presentan una enorme variedad de compuestos, muchos de ellos con unas marcadas propiedades antioxidantes e importantes efectos biológicos⁶. Los niveles de estos compuestos pueden variar dependiendo de la variedad de pimiento de que se trate, del estado de maduración que presente o de las condiciones de crecimiento que haya tenido.

El componente mayoritario de los pimientos está representado por los hidratos de carbono. También contiene proteínas en pequeña cantidad y muy pocos lípidos (grasas). Además, el pimiento posee un porcentaje muy elevado de agua (aproximadamente un 90 %).

Los pimientos rojos constituyen una fuente impresionante de vitamina C, vitamina A y licopeno, constituyéndose en uno de los alimentos desintoxicantes más importantes. Los pimientos, especialmente los pimientos rojos maduros, constituyen una fuente excelente de vitamina C. De hecho, si lo comparamos con los cítricos (naranjas, limones, pomelos, etc.), el pimiento nos proporciona más del doble de esta vitamina, por peso de fruto, siendo una de las plantas del mundo que posee más cantidad, después de la acerola o del escaramujo. También son una fuente vegetal rica en vitamina A y, en menor medida, en otras como E, B1 y ácido fólico.

Pero además, su característico color rojo nos indica también que es un alimento rico en carotenos. Algunos de ellos, como el β -caroteno, pueden ser transformados en vitamina A. De igual manera, y especialmente cuando está bien maduro y rojo, contiene, junto a los tomates, un componente denominado licopeno que constituye, al lado de la vitamina C, uno de los mejores antioxidantes.

Como las verduras en general, los pimientos son ricos en fibra dietética. Entre los minerales, esta hortaliza contiene principalmente fósforo, potasio, magnesio, hierro y calcio, con cantidades muy bajas de sodio.

Entre los compuestos con marcadas propiedades biológicas que aparecen en los pimientos destacamos los siguientes grupos de compuestos:

- **Carotenoides** entre los que destacan: xantofilas, β -caroteno, luteína, capsantina, capsorrubina, criptoxantina, zeaxantina, anteraxantina, violaxantina, neoxantina.^{7,8}
- **Vitamina A.**⁹
- **Vitaminas (B):** tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3), piridoxina (B6).¹⁰

⁶ L.R. Howard, S.T. Talcott, C.H. Brenes, B. Villalon. "Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected peeper cultivars (*capsicum species*) as influenced by maturity". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48 (5): 1713-1720, 2000.

⁷ F. Márkus, H.G. Dado, J. Kapitány, P.A. Biacs. "Change in the carotenoid and antioxidant content of spice red pepper (*Paprika*) as a function of ripening and some technological factors". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47 (1): 100-107, 1999.

⁸ O.C. Zúñiga, F.G. Jiménez, R.M. Gordillo. "Comparative estudy of carotenoid composition in three Mexican varieties of *Capsicum annuum L.*". Food Chemistry, 90: 109-114, 2005.

⁹ U. Kidmose, R.Y. Yang, S.H. Thilsted, L.P. Christensen, K. Brandt. "Content of carotenoids in commonly consumed asian vegetables and stability and extractability during frying". Journal of Food Composition and Analysis, 19: 562-571, 2006.

- Ácido ascórbico (**vitamina C**), que se encuentra en concentraciones desde 40 a 250 mg/100g de pimiento fresco.¹¹
- Tocoferol (**vitamina E**),^{12,13} que se encuentra en concentraciones desde 3 a 250 mg/100g de pimiento seco.
- **Ácidos fenólicos libres** (protocatéuico, clorogénico, cumárico, ferúlico, cinámico, cafeico, etc.).¹⁴
- **Ácidos orgánicos** (málico, oxálico, cítrico, fumárico, quínico, etc.).¹⁵
- **Azúcares solubles** (glucosa, fructosa, etc.).¹⁶
- **Flavonoides** (quercetina, luteolina, etc.).^{17,18}
- **Lípidos**.¹⁹
- **Compuestos volátiles** (aldehídos, cetonas, alcoholes, pirazinas, etc.).^{20,21}
- **Capsaicinoides** (capsaicina, dihidrocapsaicina, entre otros).²²
- **Capsinoides** (capsiato, dihidrocapsiato, entre otros).²³

¹⁰ S.W. Leonard, K. Hardin, J.E. Leklem. "Vitamin B-6 content of spices". Journal of Food Composition and Analysis, 14: 163-167, 2001.

¹¹ J.M. Navarro, P. Flores, C. Garrido, V. Martinez. "Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity". Food Chemistry, 96: 66-73, 2006.

¹² J.A. Osuna-García, M.M. Wall, C.A. Waddell. "Endogenous levels of tocopherols and ascorbic acid during fruit ripening of new mexican-type Chile (*Capsicum annuum* L.) cultivars". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46 (12): 5093-5096, 1998.

¹³ M. Koch, Y. Arango, H.P. Mock, K.P. Heise. "Factors influencing α -tocopherol synthesis in pepper fruits". Journal of Plant Physiology, 159: 1015-1019, 2002.

¹⁴ B. Estrada, M.A. Bernal, J. Díaz, F. Pomar, F. Merino. "Fruit development in capsicum annum: changes in capsaicin, lignin, free phenolics, and peroxidase patterns". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48 (12): 6234-6239, 2000.

¹⁵ P.A. Luning, T. Ebbenhorstseller, T. Derijk, J.P. Roozen. "Effect of hot-air drying on flavour compounds of Bell peppers (*Capsicum annuum*)". Journal of the Science of Food and Agriculture, 68: 355-365, 1995.

¹⁶ J. López-Hernández, M.J. Oruña-Concha, J. Simal-Lozano, M.E. Vázquez-Blanco, M.J. González-Castro. "Chemical composition of padrón Peppers (*Capsicum annuum* L.) grown in Galicia (N.W. Spain)". Food Chemistry, 57: 557-559, 1996.

¹⁷ J.J. Lee, K.M. Crosby, L.M. Pike, K.S. Yoo, D.I. Leskovar. "Impact of genetic and environmental variation on development of flavonoids and carotenoids in pepper (*Capsicum* spp.)". Scientia Horticulturae, 106: 341-352, 2005.

¹⁸ M. Materska, S. Piacente, A. Stochmal, C. Pizza, W. Oleszek, I. Perucka. "Isolation and structure elucidation of flavonoid and phenolic acid glycosides from pericarp of hot pepper fruit *Capsicum annuum* L.". Phytochemistry 63, 893-898, 2003.

¹⁹ N.P. Bekker, N.T. Ulchenko, A.I. Glushenkova. "Physicochemical properties and composition of lipids from *Capsicum annuum* seeds". Chemistry on Natural Compounds, 37: 131-133, 2001.

²⁰ P.A. Luning, T. de Rijk, H.J. Wichers, J.P. Roozen. "Gas chromatography, mass spectrometry, and sniffing port analyses of volatile compounds of fresh bell peppers (*Capsicum annuum*) at different ripening stages". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42: 977-983, 1994.

²¹ M. Zimmermann, P. Schieberle. "Important odorants of sweet bell pepper powder (*Capsicum annuum* cv. *Annuum*): differences between samples of Hungarian and morrocan origin". European Food Research and Technology, 211: 175-180, 2000.

²² K. Iwai, T. Suzuki, H. Fujiwake. "Formation and accumulation of pungent principle of hot pepper fruits, capsaicin and its analogs, in *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. *Karayatsubusa* at different growth stages after flowering". Agricultural and biological Chemistry, 43: 2493-2498, 1979.

²³ S. Yazawa, N. Suetome, K. Okamoto, T. Namiki. "Content of capsaicinoids and capsaicinoids-like substances in fruit of pepper (*Capsicum annuum* L.) hybrids made with "CH-19 Sweet" as a parent". Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 58: 601-607, 1989.

I. 1. 5. Propiedades dietéticas.

Como se ha comentado en el apartado anterior, el componente mayoritario de los pimientos está representado por los hidratos de carbono, conteniendo además proteínas en pequeña cantidad y muy pocos lípidos (grasas). Si a esto le unimos que los pimientos poseen un contenido en agua muy importante ($\approx 90\%$), hace que su valor calórico sea bajo, por lo que son muy recomendables en dietas hipocalóricas o de adelgazamiento.

Además de su riqueza en agua, su gran dotación en fibras crea en nuestros estómagos una gran sensación de saciedad, lo que permite pasar un buen periodo de tiempo sin ingerir otros alimentos, dado que ellos se van asimilando poco a poco. Esta misma fibra arrastra los residuos fecales del intestino, evitando putrefacciones y actuando de laxante, por lo que, además de ser recomendados para aquellos que quieran perder peso, también serán muy convenientes en aquellos que sufran de estreñimiento. Igualmente se ha demostrado como la ingestión de pimientos picantes incrementa el metabolismo y ayuda a eliminar grasas, debido a la acción de los capsaicinoides sobre nuestro organismo.^{24,25}

Por todo ello, los pimientos están recomendados para:

- Llevar una alimentación sana y rica en sustancias **antioxidantes**, por su riqueza en vitaminas A y C principalmente.
- Garantizar un elevado **aporte de fibra** dietética.
- Introducir **elementos protectores** en la dieta.

Los pimientos dulces o picantes tienen bastante mala fama de ser muy "indigestos", lo cual no es cierto. Curiosamente y, frente a esta opinión generalizada, los pimientos crudos son más digeribles que los cocidos y además favorecen la digestión al estimular los jugos gástricos y biliares. Incluso los pimientos picantes han demostrado tener un efecto positivo en la prevención de úlceras de estómago²⁶. El mismo componente picante (capsaicina) protege las membranas gástricas y parece impedir el desarrollo de úlceras tal como se ha demostrado en numerosos experimentos en animales. Dentro de las propiedades beneficiosas del pimiento para el aparato digestivo hemos de mencionar también sus propiedades antidiarreicas y antivomitivas.

²⁴ M. Yoshioka, T. Matsuo, K. Lim, A. Tremblay, M. Suzuki. "Effects of capsaicin on abdominal fat and serum free-fatty acids in exercise-trained rats". Nutrition Research, 20: 1041-1045, 2000.

²⁵ M. Westerterp-Plantenga, K. Diepvens, A.M.C.P. Joosen, S. Bérubé-Parent, A. Tremblay. "Metabolic effects of spices, teas, and caffeine". Physiology & Behavior, 89: 85-91, 2006.

²⁶ O.M.E. Abdel-Salam, J. Szolcsányi, G. Mózsik. "Capsaicin and the stomach. A review of experimental and clinical data". Journal of Physiology-Paris, 91: 151-171, 1997.

I. 2. PRODUCTOS ELABORADOS A PARTIR DE PIMIENTOS.

El pimiento, originario de América del Sur, fue sembrado en diversos lugares del sur del continente antes del descubrimiento. Conformar una gran variedad de especies, entre ellas el pimiento rojo común, muchas de ellas de gran interés en la cocina de todo el mundo. El fruto según las variedades y países, se llama pimiento, páprika, chile, aj, guindilla, etc.

Casi el 50 % de los platos tradicionales españoles llevan como ingrediente el pimiento ya sea fresco, seco o molido. Existen multitud de variedades de pimientos, que se pueden agrupar en dulces y picantes. Pero lo que resulta más interesante, es que estas variedades no se han perdido, porque su uso está vivo. En cada zona, hay cierta predilección por unas variedades u otras.

Los usos de los frutos naturales o procesados son múltiples. Aparte del consumo en fresco, cocido o como un condimento o "especia" en comidas tpicas de diversos países, existe una gran gama de productos industriales que se usan en la alimentación humana: congelados, deshidratados, encurtidos, enlatados, salsas, etc.

Los pimientos se utilizan básicamente de cuatro maneras diferentes. La más extendida es el consumo en fresco. Otro uso es la desecación del pimiento para la preparación del pimentón, que se obtiene de la molienda de la "cáscara", formada por los restos del pericarpio deshidratado. Este es también el origen de las oleorresinas que utiliza la industria alimentaria. La fabricación de conservas y el cultivo de variedades picantes, como las guindillas, usadas como especias, son los restantes empleos de esta hortaliza. Cada una de estas aplicaciones se asocia normalmente con un elenco específico de variedades.

El pimiento es una de las hortalizas de mayor producción mundial, por lo que su importancia económica es muy elevada, siendo para muchas regiones tanto del mundo como de España, una de las principales fuentes de riquezas. Un ejemplo de esto puede constituir la región española de la Vera, en la cual el cultivo del pimiento y la fabricación del pimentón es una de las principales fuentes de riqueza de la región.

Debido a esta enorme importancia económica, han surgido en España varias Denominaciones de Origen Protegidas (DOP) e Indicaciones Geográficas Protegidas (IGP) que tienen como protagonistas al pimiento o productos derivados de este. Cabe explicar lo que son estos dos conceptos y la importancia que pueden tener a la hora de que un producto se vea acogido bajo estas denominaciones.

En el vasto mercado europeo existe una gran riqueza y variedad de productos pero cuando un producto adquiere cierta reputación fuera de sus fronteras se puede encontrar con usurpaciones e imitaciones. Esta competencia desleal no solo desalienta a los productores sino que también engaña a los consumidores. Por ello, en 1992, la Unión Europea cre unos sistemas conocidos como DOP, IGP y ETG (Denominación de Origen Protegida, Indicación Geográfica Protegida y Especialidad Tradicional Garantizada) para promover y proteger productos agroalimentarios.

Se entiende por *Denominación de Origen Protegida (DOP)*,²⁷ el nombre de una región, de un lugar determinado o, en casos excepcionales, de un país, que sirve para designar un producto agrícola o un producto alimenticio, originario de dicha región, de dicho lugar determinado o de dicho país y cuya calidad o características se deban fundamentalmente o exclusivamente al medio geográfico con sus factores naturales y humanos, y cuya producción, transformación y elaboración se realicen en la zona geográfica delimitada.

Se entiende por *Indicación Geográfica Protegida (IGP)*,²⁷ el nombre de una región, de un lugar determinado o, en casos excepcionales, de un país, que sirve para designar un producto agrícola o un producto alimenticio, originario de dicha región, de dicho lugar determinado o de dicho país, y que posea una cualidad determinada, una reputación u otra característica que pueda atribuirse a dicho origen geográfico, y cuya producción y/o transformación y/o elaboración se realicen en la zona geográfica delimitada. Por lo tanto en las IGP, el vínculo con el medio geográfico sigue presente en al menos una de las etapas de la producción, de la transformación o de la elaboración.

Estos sistemas europeos para el desarrollo y protección de productos alimenticios tienen unas funciones determinadas, entre las que destacan:

- Estimular la producción agrícola variada.
- Proteger el abuso e imitación de nombres de productos.
- Ayudar al consumidor entregándole informaciones relacionadas con el carácter específico de los productos.

Los productos acogidos a una DOP o IGP son necesariamente productos controlados. Debe existir siempre una estructura de control que garantice el cumplimiento de los requisitos recogidos en el Reglamento correspondiente. Los servicios de control deberán ofrecer garantías suficientes de objetividad e imparcialidad respecto de todos los productores o transformadores sometidos a su control y por otra parte contar de manera permanente con los expertos y medios necesarios para efectuar los controles de los productos agrícolas y alimenticios que ostenten una DOP o IGP. No podemos olvidar que lo importante de los controles es que den confianza a los consumidores, para que puedan comprar y consumir un producto de total calidad.

Las Denominaciones de Origen Protegidas y las Indicaciones Geográficas Protegidas que existen en España, que tienen como protagonistas al pimiento o a productos elaborados a partir de éste son las siguientes:

- **D. O. P. “Pimiento del Piquillo de Lodosa”.**²⁸ (Navarra).

Los pimientos de la variedad **piquillo**, acogidos a la Denominación, sólo se comercializan envasados en frascos de cristal o botes de hoja de lata. El fruto es de color rojo, de sabor dulce, de longitud inferior a 10 cm., de forma triangular de sabor agradable y persistente y muy apropiado para consumo directo y guarniciones.

²⁷ http://ec.europa.eu/agriculture/qual/es/aoig_es.htm (revisado 01/07).

²⁸ Consejo Regulador de la D.O. "Pimientos del Piquillo de Lodosa".

➤ **D. O. P. “Pimentón de la Vera”.**²⁹ (Cáceres).

El **Pimentón de la Vera** es el resultado de la molienda de los frutos secos de los pimientos cultivados, cuidadosamente seleccionados y sometidos a un proceso de secado tradicional de forma manual hasta conseguir el grado idóneo de secado. Los pimientos cultivados pertenecen a la especie “*Capsicum annuum*” de la variedad “*Cesariforme*” y “*Longum*”. La producción actual del Pimentón de la Vera oscila alrededor de las 2000 toneladas por campaña.

➤ **D. O. P. “Pimentón de Murcia”.**³⁰ (Murcia).

En la comarca del campo de Cartagena, el clima y el suelo son muy apropiados para el cultivo de pimientos de la especie *Capsicum annuum* L., de la variedad “*Bola*”. Recolectados maduros, sanos, limpios y secos, libres de ataques de plagas o enfermedades, se muelen y se obtiene un pimentón dulce, de sabor fuerte, penetrante y característico, de gran poder colorante, graso y sabroso. El color rojo brillante es muy estable.

➤ **I. G. P. “Pimiento Riojano”.** (La Rioja).

La variedad de pimiento “*Najerano*” es autóctona de La Rioja, donde se cultiva casi en exclusividad. Se recolecta cuando el fruto está maduro, su color es rojo intenso, el sabor dulce y la carne fina. Las conservas elaboradas con este pimiento, se presentan en cuadros o tiras y siempre envasadas en su propio jugo, sin líquido de gobierno. Ésta Indicación Geográfica Protegida ampara una producción de 234000 kilos.

➤ **I. G. P. “Pimiento Asado del Bierzo”.** (León).

Se produce en la comarca del Bierzo al noroeste de la provincia de León en los municipios de Cacabelos, Camponaraya, Carracedelo, Ponferrada, Toral de los Vados y Villafranca. Los pimientos son de forma triangular alargada pero de punta roma, con tres lóbulos como máximo y carne de espesor medio y muy sabrosa. El asado sólo se puede hacer entre el 15 de Agosto y el 20 de Noviembre y se presenta descorazonado y pelado.

Otros pimientos de reconocida fama, cultivados en España, pero que no están adscritos a estos sistemas de calidad son los siguientes:

- Pimiento de Padrón. (La Coruña).
- Pimiento de Guernika. (Vizcaya).
- Pimiento Morrón de Fresno-Benavente. (León).
- Ñoras de Guardamar. (Alicante).
- Guindillas de Ibarra. (Guipúzcoa).
- Pico de Mendavia. (Navarra).

²⁹ Consejo Regulador de la D.O. "Pimentón de la Vera".

³⁰ Consejo Regulador de la D.O. "Pimentón de Murcia".

El pimiento, además de fresco, en forma de ensaladas, gazpachos, o en diversos platos, se comercializa en distintas formas como puede ser en forma de pimentón, en conservas, como salsas, como oleorresinas, etc. A continuación se comentarán algunos de estos productos que proceden de los pimientos.

I. 2. 1. Pimentón.

El **pimentón** es el producto resultante de la molienda de pimientos totalmente rojos recolectados maduros, sanos, limpios y secos, totalmente libres de ataques de plagas o enfermedades.

El pimentón en polvo además de saborizante, se utiliza como agente colorante en la cocina doméstica y en la industria alimentaria. El pimiento picante molido otorga sabor picante a los alimentos.



Figura 4: *Pimentón.*

El cultivo del pimiento se extendió rápidamente por España, tras su llegada de América, y por el resto de Europa, alcanzando una gran fama en países como Hungría, en el que el pimentón se denomina páprika y es el ingrediente principal de platos tan típicos como el gulash. El país que primeramente, se cree, utilizó el pimentón (Paprika) como condimento en su cocina fue Hungría. En España se comercializa desde hace un siglo en la región murciana y en la comarca del Valle del Jerte.

El consumo y destino del pimentón deriva principalmente a dos sectores: el de la restauración, orientado a la utilización culinaria del mismo, especialmente envasado en pequeños formatos de latas y bolsas; y el chacinero, orientado a la elaboración de embutidos y contribuyendo a su conservación, o en adobos, para lo cuál se utilizan las especialidades de dulce, agridulce o picante.

Podemos encontrar tres tipos de pimentón según su origen: el dulce, el agridulce y el picante. La variedad más empleada en la cocina diaria es el pimentón dulce, que aporta a los platos un aroma frágil y su presencia pasa más desapercibida que otras especias y condimentos. El pimentón picante se utiliza sobre todo en los productos de chacinería como el chorizo, la chistorra, la sobrasada y como adobo de carnes y pescados. La importancia de esta especia como conservante de las chacinas fue tan grande en el pasado que se le llegó a llamar "oro rojo".

En España existen, como ya se comentó, dos Denominaciones de Origen Protegidas que regulan la elaboración del pimentón, siendo las siguientes:

- ☞ **D. O. P. “Pimentón de la Vera”.**
- ☞ **D. O. P. “Pimentón de Murcia”.**

Cabe esperar que en España las zonas pimentoneras más importantes sean Murcia y la comarca de la Vera, en Cáceres. Otros países productores de pimentón, son Marruecos, Pakistán y Chile.

La producción actual del Pimentón de la Vera oscila alrededor de las 2.000 toneladas por campaña. El 65 % de la misma está acogida a la Denominación de Origen "Pimentón de la Vera".

La siembra del pimiento que dará lugar posteriormente al pimentón, se realiza entre los meses de abril y mayo y se recolecta en septiembre. Una vez recogido el fruto se procede a su desecación, que puede llevarse a cabo en secaderos industriales, por la acción del sol o por deshidratación al humo. Cuando está seco se lleva a los molinos donde finalmente es triturado, obteniendo un polvo fino de un color que varía de rojo-naranja a rojo intenso.

Elaboración del Pimentón.

En la elaboración del pimentón podemos diferenciar tres fases: La primera es el cuidado de la plantación; la segunda fase el secado del fruto, secado natural, por exposición al sol y/o secado mediante aire caliente; y como tercera fase el molido. Una vez secos los pimientos se realizan varios pases de molino dando origen a un fino polvo de color rojo intenso.

➤ Cuidado de la plantación.

El cultivo del pimiento para pimentón, empieza en el mes de febrero o marzo, con la siembra en los semilleros apropiados. En mayo se procede al trasplante en los terrenos de cultivo previamente preparados y allanados. Se siembra con maquinaria y posteriormente se hacen los surcos, simétricos y rectilíneos, para arropar mejor la planta. Una vez los frutos están maduros, entre septiembre y octubre, tiene lugar la recolección y selección de los pimientos. La recolección se realiza escalonadamente según vayan madurando los frutos.

Los terrenos donde se cultiva el pimentón anualmente han de ser tierras de muy buena calidad, con gran cantidad de materia orgánica, aguas de tierra sin salinidad y un clima benigno. Una vez recolectado el pimiento, se lleva a los secaderos para su transformación en el producto final.

➤ **Secado de los pimientos.**

Una vez los pimientos han sido recolectados y seleccionados, se procede al secado de éstos. La técnica de secado que se emplea es diferente dependiendo de la región productora de pimentón. El secado puede ser natural, por exposición al sol en pistas de secado durante varios días y/o secado mediante aire caliente.

Por ejemplo, en la Denominación de Origen del Pimentón de la Vera, debido a las pocas horas de sol de esta zona, la deshidratación de los pimientos se lleva a cabo en secaderos mediante corriente de humo procedente de la combustión de madera, siendo precisamente ésta la característica principal que diferencia el cultivo del Pimentón de la Vera de otros.

La laboriosa técnica de la deshidratación o secado al humo se pone en marcha tras la recolección del pimiento y su transporte al secadero donde se colocan sobre unos listones de madera que se encuentran en la parte alta de los edificios, bajo ellos arde un fuego con leña de encina o roble cuyo calor, que también aporta humo, seca el producto. Además de tener que mantener una temperatura constante en todo el proceso, es preciso voltear el producto diariamente para que el secado sea uniforme.

El proceso de secado necesita una temperatura constante y deberá durar un mínimo de diez días para asegurar así un contenido en humedad máximo del 15 % al finalizar el mismo, lo que depende en gran medida del grado de maduración del pimiento. Son necesarios 5 kilogramos de leña por cada kilo de pimiento ya seco.

Este sistema aporta al Pimentón de la Vera sus características únicas de aroma, sabor y estabilidad de color.

➤ **Molienda del pimiento.**

Al secado del fruto le sigue la molienda de los pimientos secos y sanos, siendo el primer paso el de quitar el pezón de la cáscara del pimiento (despezonado), para posteriormente tritararlo con varios pases de molienda con lo que se consigue un aspecto pulverulento de textura fina, de color rojo intenso. Los molinos pueden ser de piedra o de acero inoxidable, pero en cualquier caso, no se deben alcanzar temperaturas elevadas. Una alta temperatura durante el molido reduce el contenido en carotenoides y consecuentemente el color y la calidad del producto.

Por ejemplo, en la Denominación de Origen del Pimentón de la Vera, durante la molienda en ningún caso se podrán superar temperaturas superiores a los 50 °C para asegurar no sólo su calidad sino también la obtención de un polvo rojo, fino y uniforme. En esta Denominación de Origen, la molienda de los pimientos se lleva a cabo en molinos de piedras. De aquí pasa a la criba donde extraerán cualquier impureza, y después de dejarlo secar, se volverá a cribar para proceder en último término a su envasado.

I. 2. 2. Conservas de pimientos.

Como la gran mayoría de alimentos, los pimientos también son utilizados para su uso como **conservas**. Los pimientos utilizados para conservas se pueden presentar bien enlatados, o en tarros de cristal cerrados herméticamente.



Figura 6: *Conservas de pimientos.*

En España se dedican al cultivo de variedades de pimiento en conserva alrededor de 5000 ha, con una producción en 1995 de 64000 toneladas, aunque en los últimos años se viene observando que también se utiliza como materia prima para conserva los restos de la producción de invierno y del aire libre de algunas variedades inicialmente cultivadas para el mercado en fresco.

Tres son las principales especialidades conserveras: conserva al natural, conserva en vinagre (encurtidos) y congelados. Las dos primeras son las económicamente más importantes. En la conserva al natural, la especialidad de frutos asados enteros es la conserva más popular en España. Se hace con frutos de al menos tres diferentes grupos de variedades españolas de pimiento, los denominados “*Morrones*”, “*Piquillos*” y “*Picos*”.

A nivel internacional, se pueden distinguir numerosas especialidades conserveras, generalmente dependientes de las preferencias de los consumidores de cada área. Aparte habría que considerar las innumerables salsas y platos semipreparados o preparados, en las que interviene el pimiento.

Los pimientos utilizados para conservas se envasan bien solos, al natural, o rellenos de otros productos. Entre los rellenos que más se utilizan para los pimientos son: bacalao, bacalao y gambas, merluza, merluza y gambas, mariscos, carne, bonito, lenguado, lenguado con langostinos, rape, etc.

Conservas al natural.³¹

Con respecto a las conservas de pimientos al natural se distinguen los siguientes tipos de conservas de pimientos:

³¹ P. Deleuze Isasi. Legislación Alimentaria “*Código alimentario español y disposiciones complementarias*”. Editorial Tecnos. Madrid. Séptima edición, actualizada 2006.

- ☞ **Conservas de pimientos rojos.**
- ☞ **Conservas de pimientos verdes.**
- ☞ **Conservas de pimientos amarillos.**

Las conservas más ampliamente empleadas son las conservas de pimientos rojos. Las conservas de pimientos rojos son los productos obtenidos a partir de los frutos sanos, limpios y maduros de la planta *Capsicum annum*, L var. *Grossum*, que han alcanzado el color característico de la variedad, convenientemente desprovistos de piel, de corazón y de semillas, con o sin adición de agua y esterilizados mediante empleo exclusivo de calor, en envases herméticamente cerrados. Podrán además adicionarse facultativamente, uno o varios de los ingredientes citados más adelante.

Caracteres sanitarios: Los pimientos que se utilicen para la preparación de las conservas deberán estar sanos, limpios y exentos de lesiones y de manchas anormales, así como de cualquier otro defecto que pueda afectar a su consumibilidad, al buen aspecto del producto final o posibilidad de adecuada conservación.

Ingredientes autorizados: En la preparación de estas conservas podrán utilizarse los ingredientes que más adelante se señalan y en las proporciones máximas que se indican, y para las que no se fija límite, las que se emplean corrientemente en las prácticas de fabricación correctas hasta tanto se vayan fijando otras por el Código Alimentario Español:

- a) **Sal común.**
- b) **Sacarosa.**
- c) **Aceites vegetales comestibles.**
- d) **Vinagre.**
- e) **Ácido cítrico, tartárico, málico y láctico.** Cloruro cálcico, sulfato cálcico, fosfato monocálcico y sales cálcicas de los ácidos especificados en el apartado anterior. La cantidad total de calcio en el producto final no excederá de 300 partes por millón como ion calcio.
- f) **Ácido benzoico y su sal sódica,** solamente para los formatos de 3 kg. y superiores con un límite máximo del 0,1 % del peso neto.

La adición de ácidos se efectuará en cantidad tal que favorezca la esterilización sin afectar seriamente el sabor del producto.

En España existen, como ya se comentó, varias Denominaciones de Origen Protegidas e Indicaciones Geográficas Protegidas que regulan la fabricación de conservas de pimientos, siendo las siguientes:

- ☞ **D. O. P. “Pimiento del Piquillo de Lodosa”.**
- ☞ **I. G. P. “Pimiento Asado del Bierzo”.**
- ☞ **I. G. P. “Pimiento Riojano”.**

La especialidad de frutos asados enteros es la conserva más popular en España. Las conservas de pimientos acogidas a una Denominación de Origen, además de ser sometidas a una serie de controles continuados sobre su procedencia y calidad, son asados en hornos

de llama directa, pelados, descorazonados y eliminadas las semillas a mano, sin sumergirlos en agua o soluciones químicas y envasados en su propio jugo.

El proceso de elaboración de las conservas de pimientos, por lo general consta de las siguientes etapas:

- **Siembra de la planta:** Al igual que ocurría con los pimientos utilizados para pimentón, la siembra de los pimientos que se utilizarán en conservas, se realiza en semilleros en los meses de febrero y marzo. El trasplante de la planta al suelo se lleva a cabo por el mes de mayo.
- **Recolección:** La recolección se efectúa, de manera selectiva desde septiembre y durante los meses de octubre y noviembre. Se realizan varios pases recogiendo únicamente aquellos pimientos que estén en óptimas condiciones para la industria. En la recolección se realiza la primera selección de los pimientos que van a ser utilizados para conservas.
- **Recepción:** A la llegada en la fábrica, el pimiento se almacena en un lugar cubierto y bien aireado.
- **Selección:** En la fábrica se realiza una selección de los pimientos, eliminándose los frutos con defectos, daños o marcas.
- **Asado:** los pimientos se suelen asar mediante un horno de llama directa.
- **Pelado:** Tras el asado del pimiento, se procede al pelado del mismo y a la eliminación de las semillas.
- **Clasificación:** A continuación se clasifican los pimientos según su color y tamaño.
- **Llenado:** Después se introducen los pimientos en latas o frascos de cristal.
- **Esterilización:** El objetivo de este procedimiento es eliminar toda posibilidad de desarrollo bacteriano. Tras el llenado de las latas o tarros y su cerrado hermético, se procede a la esterilización. Tras la esterilización se produce un rápido enfriamiento.
- **Almacenamiento:** Por último, las latas o los botes se almacenan hasta su transporte para la venta.

Dependiendo de la zona o de la Denominación de Origen en la que esté amparada la fabricación de la conserva de pimiento, la elaboración de ésta va a presentar alguna peculiaridad determinada.

En la Indicación Geográfica Protegida “Pimiento Asado del Bierzo”, los pimientos se asan directamente en una chapa con leña, para que así mantengan toda su esencia, y adquieran a la vez el olor y el sabor que les da el contacto directo con la leña al arder. Después se pelan en seco, a mano, sin contacto alguno con agua ni sustancia química. Una vez pelados, se llenan “A tope” los tarros de cristal, únicamente con el jugo que sueltan los propios pimientos, añadiéndole a cada tarro un poquito de limón exprimido. Finalmente se cierra el tarro y ya por último, se cuecen al baño maría.

En la Denominación de Origen Protegida “Pimiento del Piquillo de Lodosa”, los pimientos son seleccionados cuidadosamente antes de someterlos al proceso de elaboración, eliminando los frutos defectuosos, dañados y rotos. Los pimientos se asan

con leña o al carbón, en un horno que está a una temperatura que oscila entre los 700° y los 800 °C. Con esta temperatura se consigue asar el pimiento instantáneamente. Luego son descorazonados y pelados a mano, sin agua ni otro tipo de disolución, ya que desvirtuaría su sabor. Los pimientos se envasan al natural, con el acompañamiento solamente de su propio jugo. Los pimientos del Piquillo de Lodosa se presentan envasados en latas o en envases de cristal.

I. 2. 3. Oleorresina.

Otro derivado del pimiento es la oleorresina. La **oleorresina** es el aceite resultante del proceso de extracción y concentración del pimiento y del pimentón. Es un aceite viscoso que tiene color rojo intenso y aroma típico del pimentón, fluido a temperatura ambiente y muy soluble en aceite.

La necesidad de contar con un producto que mantuviese las características del pimentón, para su uso en la creciente industria alimentaria, originó en los años treinta una corriente de investigación que desembocó en la aparición de la oleorresina. La oleorresina elimina los inconvenientes del pimentón, tales como la notable pérdida de color, y sin embargo, incorpora a su intenso poder colorante, las características del pimentón en cuanto a sus propiedades como condimento.

La oleorresina presenta ventajas técnico-económicas respecto a la forma tradicional de exportación (pimentón), entre las que destacan:

- ☞ Uniformidad del aroma.
- ☞ Uniformidad del color.
- ☞ Estabilidad del producto.
- ☞ Facilidad de manejo y almacenamiento.
- ☞ Resistencia a alteraciones microbiológicas.

Existen dos tipos de oleorresina: la oleorresina soluble en aceite (liposoluble), que es la oleorresina en su estado puro, resultante del proceso de extracción, y la oleorresina soluble en agua (hidrosoluble), mediante la incorporación de un polisorbato vegetal. Este tipo de oleorresina está especialmente indicada para su uso en la industria alimentaria, elaboración de sopas, bebidas, conservas, etc.

La oleorresina, es uno de los colorantes orgánicos naturales permitidos para uso alimentario por las diferentes normativas de cada país. Se puede decir que un kilo de oleorresina de pimentón de 100.000 Uds de color de la variedad "*capsicum*", equivale a unos 20 kilos de pimiento de primera calidad, aunque su poder de coloración es muy superior, ya que mantiene su intenso color durante más tiempo.

La oleorresina de pimientos se utiliza como colorante natural en productos alimenticios procesados. Además se emplea en la industria cosmética. Entre sus principales usos cabe resaltar:

- ☞ Confituras, jaleas, mermeladas, etc., las cuales son más apetecibles al incorporarles oleorresina.
- ☞ Los huevos y carnes de aves se colorean añadiendo oleorresinas a sus piensos.
- ☞ En la industria farmacéutica, se usa también oleorresina soluble en la composición de algunos medicamentos.
- ☞ Cuando se precisa un color brillante y vivo en la fabricación de alimentos.
- ☞ En la fabricación de salsas, ensaladas, embutidos, conservas, comidas preparadas, salchichas, etc.
- ☞ Pescados en conserva de aceite, algunos tipos de sopa y comida congelada.
- ☞ Mantequillas, margarina y quesos, son también coloreados con oleorresina de pimientos, además de patatas fritas, chips, aperitivos, cereales para desayuno en copos o expandidos, productos de harina (galletas, tortas, etc.), gelatina y pudines, bebidas alcohólicas y no alcohólicas, etc.
- ☞ Pigmentación de truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

Elaboración.

Para producir oleorresinas de excelente intensidad de color, los frutos son tratados adecuadamente descartándose las venas, semillas, tejidos de placenta, pedúnculo y el cáliz, quedando sólo el pericarpio.

En la elaboración de la oleorresina, en muchas ocasiones, para evitar pérdidas de color y aroma debido a las altas temperaturas alcanzadas durante operaciones de molienda, se opta por triturar el pericarpio del pimiento seco, lográndose partículas pequeñas y lisas que permiten una veloz penetración del disolvente y una rápida transferencia del soluto hasta su total extracción. La oleorresina se produce mediante sistemas de extracción sólido-líquido, empleándose disolventes orgánicos adecuados como el hexano, bajas temperaturas de extracción y concentración al vacío.

Los principales fabricantes de oleorresinas de pimientos son España y Estados Unidos, y la producción de ambos se estima en más de 400 toneladas por año. Este producto se consume casi exclusivamente en América del Norte y en Europa. El principal mercado es Estados Unidos seguido del Reino Unido.

I. 2. 4. Salsas y condimentos picantes.

Las variedades picantes de pimientos son ampliamente utilizadas para la elaboración de salsas y condimentos picantes para aderezar y dar sabor picante a alimentos y comidas. Los condimentos picantes son utilizados ampliamente en casi todas las partes del mundo, presentando una especial tradición en su uso en el continente americano y asiático, utilizándose este tipo de condimento picante en la mayoría de los platos tradicionales de muchos de estos países.

La utilización de condimentos picantes en las comidas puede ser a través de pimientos picantes enteros, bien frescos o secos, así como la utilización de polvo de pimiento seco (pimentón) o de salsas elaboradas a partir de pimientos. Todos estos ingredientes son

utilizados como especias para dar color y sabor picante a las comidas para reforzar determinadas características organolépticas a los platos.

De esta manera, existen en el mercado una gran variedad de pimentones picantes, guindillas y cayenas picantes, salsas picantes (salsa de tabasco, salsa para tacos, salsa barbacoa picante, salsa de ají, salsa guacamole picante, salsa picante para pimiento choricero, etc.), ketchups picantes, etc., con distintos grados de pungencia según el gusto del consumidor.



Figura 7: Salsas picantes.

Los pimientos picantes han sido utilizados para el consumo humano desde muy antiguo en el continente americano (lugar de procedencia de los pimientos). Cristóbal Colón tras su primer viaje al Nuevo Mundo introdujo en Europa los pimientos picantes. Desde entonces este fruto se extendió rápidamente por todo el mundo y comenzó a ser utilizado como un condimento más en las comidas y platos. En la actualidad el consumo de alimentos picantes está muy extendido y la variedad de sus aplicaciones son prácticamente ilimitadas.

I. 3. CAPSAICINOIDES.

I. 3. 1. Características generales.

Los capsaicinoides son los compuestos que le dan el sabor picante al pimiento, los cuales son un grupo de amidas ácidas formados a partir de la vanillilamina y ácidos grasos de 8 a 13 átomos de carbono, entre los cuales destacan dos, la capsaicina, (*E*)-*N*-[(4-hidroxi-3-metoxifenil)metil]-8-metil-6-nonenamida, y la dihidrocapsaicina, que es el 6,7-dihidroderivado de la capsaicina. Estos dos capsaicinoides mayoritarios representan por lo general el 90 % de los capsaicinoides totales presentes en las variedades picantes de pimientos³². El siguiente capsaicinoide en importancia es la nordihidrocapsaicina, que por lo general está presente en proporciones que oscilan del 4 al 8 % del total de capsaicinoides presentes en los pimientos. Además de estos tres compuestos mayoritarios, más de 12 capsaicinoides han sido encontrados como compuestos minoritarios^{33,34}. Algunos de estos capsaicinoides minoritarios son: nordihidrocapsaicina, norcapsaicina, homocapsaicina I, homocapsaicina II, homodihidrocapsaicina I, homodihidrocapsaicina II, nornorcapsaicina, nornornorcapsaicina³⁵, nonivamida, vanillilamida del a. decílico y vanillilamida del a. caprílico.

Por lo general, la capsaicina es el capsaicinoide mayoritario presente en las variedades picantes de pimientos, pero no es extraño encontrar variedades de pimientos en las cuales el capsaicinoide más abundante sea la dihidrocapsaicina.³⁵

El esqueleto base de los capsaicinoides tiene la siguiente estructura.

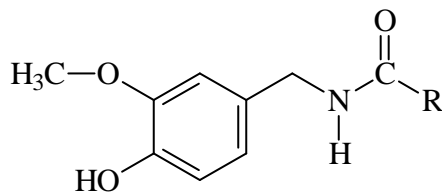


Figura 8: Estructura base de los capsaicinoides.

Dependiendo del número de carbonos de la cadena lateral (R) o de si poseen o no insaturaciones podemos tener los distintos capsaicinoides naturales que existen, tal como vienen recogidos en la tabla 3 en la que se representan las cadenas más abundantes presentes en los capsaicinoides en la naturaleza:

³² D.J. Bennett, G.W. Kirby. "Constitution and biosynthesis of capsaicin". Journal of the Chemical Society C-Organic, 4: 442-446, 1968.

³³ H.L. Constant, G.A. Cordell. "Nonivamide, a constituent of Capsicum Oleoresin". Journal of Natural Products, 59 (4): 425-426, 1996.

³⁴ H.L. Constant, G.A. Cordell. "Separation and quantification of capsaicinoids using complexation chromatography". Journal of Natural Products, 58 (12): 1925-1928, 1995.

³⁵ Y. Zewdie, P. W. Bosland. "Capsaicinoid profiles are not good chemotaxonomic indicators for Capsicum species". Biochemical Systematics and Ecology, 29: 161-169, 2001.

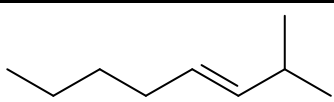
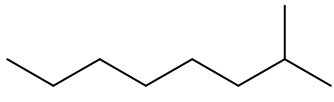
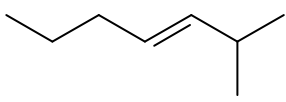
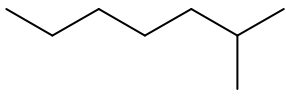
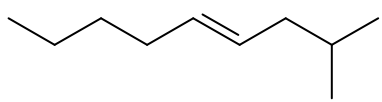
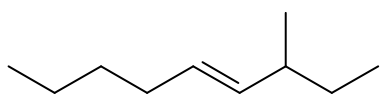
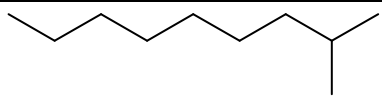
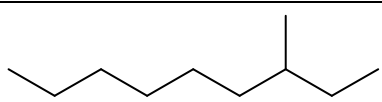
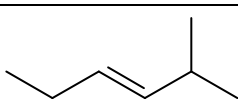
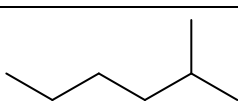
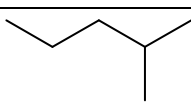
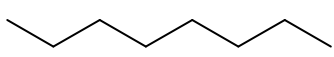
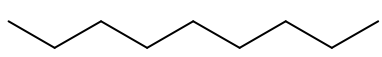
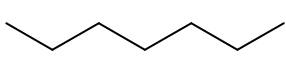
R =	NOMBRE
	Capsaicina
	Dihydrocapsaicina
	Norcapsaicina
	Nordihydrocapsaicina
	Homocapsaicina I
	Homocapsaicina II
	Homodihydrocapsaicina I
	Homodihydrocapsaicina II
	Nornorcapsaicina
	Nornordihydrocapsaicina
	Nornornordihydrocapsaicina
	Nonivamida
	Vanillilamida del a. Decílico
	Vanillilamida del a. Caprílico

Tabla 3: Distintas cadenas laterales que pueden presentar los capsaicinoides naturales.

Los capsaicinoides hasta el momento únicamente se han descrito en los frutos de las plantas del género *Capsicum*. Trabajos publicados sobre la biosíntesis de estos compuestos³⁶ han demostrado que la parte vanillilamina de la molécula es sintetizada a partir de la vía de los fenilpropanoides y la parte procedente del ácido graso proviene de los aminoácidos leucina, valina o isoleucina. El paso final combina ambas partes y se piensa que ocurre en las membranas de las vacuolas de las células de la placenta del fruto. De esta forma los capsaicinoides se acumulan en las vacuolas y posteriormente se produce una secreción extracelular.³⁷

Se sabe que los capsaicinoides son biosintetizados y acumulados en la placenta del pimiento³⁸. Se ha examinado la estructura celular de la placenta usando un microscopio óptico y se ha observado que durante la maduración tienen lugar algunos cambios morfológicos en el tejido epidérmico de la placenta. Parece ser que las células epidérmicas de la placenta son el lugar donde se acumulan los capsaicinoides. También se encuentran capsaicinoides en otros tejidos de la planta como en el pimiento (pericarpio) o en las semillas, pero en cantidades mucho menores que en la placenta.

Las concentraciones de capsaicinoides en las variedades picantes de pimientos varían muy significativamente unas de otras. Las variedades poco picantes de pimientos tienen concentraciones de capsaicinoides que van desde los 0,003 % a 0,01 % en peso seco del pimiento. Las concentraciones de capsaicinoides de las variedades picantes suaves van desde 0,01 % a 0,3 %, y las variedades fuertemente picantes se caracterizan por tener un contenido superior al 0,3 % en capsaicinoides del peso seco total, pudiendo llegar a alcanzarse el 1 %.³⁹

Otros estudios sobre capsaicinoides han demostrado que el contenido en capsaicinoides está genéticamente controlado, pero también se ve afectado por variables medio ambientales como la temperatura, la luz, la humedad del suelo o los niveles de fertilización de éste.^{40,41,42}

³⁶ B. Koop, J. Jurenitsch. "Biosynthesis of capsaicinoids in *Capsicum annuum* L. var. *annuum*. II Formation of the fatty acid moiety of the capsaicinoids from L-valina, L-leucina and L isoleucina". *Planta Medica*, 43: 272-279, 1981.

³⁷ P. Kirschbaum-Titze, E. Mueller-Seitz, M. Petz. "Pungency in Paprika (*Capsicum annuum*) 2. Heterogeneity of capsaicinoid content in individual fruits from one plant". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (5): 1264-1266, 2002.

³⁸ K. Iwai, T. Suzuki, H. Fujiwake. "Formation and accumulation of pungent principle of hot pepper fruits, capsaicin and its analogues, in *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. *Karayatsubusa* at different growth stages after flowering". *Agricultural and Biological Chemistry Tokyo*, 43: 2493-2498, 1979.

³⁹ I. Perucka, W. Oleszek. "Extraction and determination of Capsaicinoids in fruit of hot pepper *Capsicum annuum* L. by spectrometry and high-performance liquid chromatography". *Food Chemistry*, 71: 287-291, 2000.

⁴⁰ B. Estrada, M.A. Bernal, J. Díaz, F. Pomar, F. Merino. "Capsaicinoids in vegetative organs of *Capsicum annuum* L. in relation to fruiting". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (5): 1188-1191, 2002.

⁴¹ B. Estrada, F. Pomar, J. Díaz, F. Merino, M.A. Bernal. "Pungency level in fruits of the Padron pepper with different water supply". *Scientia Horticulturae*, 81: 385-396, 1999.

⁴² B. Estrada, F. Pomar, J. Díaz, F. Merino, M.A. Bernal. "Effects of mineral fertilizar supplementation on fruit development and pungency in 'Padron' peppers". *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 73: 493-497, 1998.

I. 3. 2. Efectos y aplicaciones de los capsaicinoides.

Como se comentó anteriormente, el capsaicinoide mayoritario presente en los pimientos picantes es la capsaicina. El contenido en capsaicina en los pimientos rojos picantes puede llegar incluso al 1 % del peso seco del pimiento. La capsaicina provoca numerosos efectos biológicos, por lo que ha sido objeto de numerosas investigaciones desde su elucidación estructural en 1919.^{43,44}

Debido a que el consumo de capsaicinoides como la capsaicina y la dihidrocapsaicina es muy elevado, por ejemplo en aditivos alimenticios picantes o en el consumo de pimientos picantes, y que los capsaicinoides se aplican muy frecuentemente en medicina, se hizo necesaria una evaluación correcta y una valoración precisa de cualquier efecto dañino que estos compuestos pudieran ocasionar a la salud.

La ingestión de grandes cantidades de capsaicina produce alteraciones bioquímicas e histopatológicas, incluyendo la erosión de la mucosa gástrica y la necrosis hepática. Incluso se cita en la bibliografía la muerte de un bebé de ocho meses como resultado de la ingestión de un remedio casero tomado como infusión de pimientos picantes en polvo.⁴⁵

Estos compuestos aparte de su amplia utilización en alimentación, presentan una enorme variedad de propiedades y de aplicaciones como pueden ser:

➤ Antimutagénico y antitumoral.

Numerosas investigaciones han llegado a determinar el potencial mutagénico y la actividad carcinogénica que presenta la capsaicina y los pimientos picantes, pero estos resultados son muy discordantes⁴⁶, presentando efectos duales.

Hay estudios que demuestran que la administración de capsaicina en la dieta de ratones albinos provoca la aparición de tumores duodenales⁴⁷. Otros estudios sugieren que tanto la capsaicina como los extractos de los pimientos picantes actúan como agentes co-carcinogénicos y promotores de tumores.⁴⁸

Hay otros muchos estudios en los que el efecto cancerígeno y mutagénico de la capsaicina no está tan claro. En muchos de estos estudios, se observa que la capsaicina no posee las propiedades mutagénicas o carcinogénicas que presentan determinados compuestos. Estudios epidemiológicos llevados en Méjico, revelan que los consumidores

⁴³ E.K. Nelson. "The Constitution of capsaicin, the pungent principle of capsicum". Journal of the American Chemical Society, 41: 1115-1121, 1919.

⁴⁴ E.K. Nelson, L.E. Dawson. "The Constitution of capsaicin, the pungent principle of capsicum. III". Journal of the American Chemical Society, 45: 2179-2181, 1923.

⁴⁵ T. Snyman, M.J. Stewart, V. Steenkamp. "A fatal case of pepper poisoning". Forensic Science International, 124: 43-46, 2001.

⁴⁶ Y.J. Surh, S.S. Lee. "(Short Review) Capsaicin in hot Chili Pepper: carcinogen, co-carcinogen or anticarcinogen?". Food and Chemical Toxicology, 34: 313-316, 1996.

⁴⁷ B. Toth, P. Gannett. "Carcinogenicity of lifelong administration of capsaicin of hot pepper in mice". In Vivo, 6: 59-63, 1992.

⁴⁸ C. R. Agrawal, M. Wiessler, E. Hecker and V. S. Vides. "Tumour promoting effects of chilli extract in BALB/c mice". International Journal of Cancer, 38: 689-695, 1986.

de pimientos picantes tienen el mismo riesgo de padecer cáncer de estómago que aquellos que no los consumen.⁴⁹

Por el contrario, en los últimos años, están apareciendo un gran número de estudios que apuntan al potencial quimiopreventivo que presenta la capsaicina. Se ha comprobado que los extractos de pimientos picantes, o los capsaicinoides aislados bloquean los procesos de carcinogénesis y mutagénesis.⁵⁰

Se sugiere que la capsaicina ejerce un efecto quimiopreventivo a través de la modulación del metabolismo de muchos compuestos cancerígenos y mutagénicos y sus interacciones con el ADN. Por ejemplo, los capsaicinoides protegen poderosamente la mutagénesis bacteriana producida por la aflatoxina B₁. También se observa que el pretratamiento tópico con capsaicina en ratones atenúa el carcinoma de piel inducido por el vinil carbamato.⁵¹

En resumen, la capsaicina posee un doble efecto en la inducción del cáncer y de las mutaciones. Aunque una pequeña cantidad de capsaicina manifiesta o muy pocos o ningún efecto nocivo, una elevada ingesta de este compuesto está asociada con necrosis, úlceras e incluso cánceres. Por el contrario, la capsaicina tiene la habilidad de alterar el metabolismo de muchos compuestos cancerígenos, lo cual proporciona una vía de aplicación de este compuesto en la quimiopreención.⁴⁶

➤ **Antioxidantes.**⁵²

Los pimientos son una magnífica fuente de antioxidantes susceptibles de ser utilizados en la dieta. Presentan no sólo compuestos antioxidantes muy extendidos en el mundo vegetal como pueden ser flavonoides, ácidos fenólicos, carotenoides, vitamina A, ácido ascórbico, tocoferoles, sino también constituyentes antioxidantes específicos como los capsaicinoides y los capsinoides.⁵³

Los capsaicinoides presentan una actividad antioxidante muy interesante. Se conoce que la capsaicina y la dihidrocapsaicina son capaces de inhibir la peroxidación lipídica catalizada por cationes Fe³⁺ y la oxidación de lipoproteínas de baja densidad producida por cationes cobre. Este efecto es atribuido a la capacidad de estos compuestos para formar complejos con estos metales reducidos, actuando además como donadores de hidrógenos.

La capsaicina puede también prevenir la oxidación del ácido oleico a altas temperaturas⁵⁴ al igual que previene la formación de hidroperóxidos lipídicos provenientes de la auto-oxidación del ácido linoleico.⁵⁵

⁴⁹ L. López-Carillo, M.H. Avila, R. Dubrow. "Chili pepper consumption and gastric cancer in Mexico: a case control study". American Journal of Epidemiology, 139: 263-271, 1994.

⁵⁰ M.C. Unnikrishnan, R. Kuttan. "Tumor reducing and anticarcinogenic activity of selected spices". Cancer Letters, 51: 85-89, 1990.

⁵¹ Y.J. Surh, C.R.J. Lee, K.K. Park, S.T. Mayne, A. Liem, J.A. Miller. "Chemoprotective effects of capsaicin and diallyl sulfide against mutagenesis or tumorigenesis by vinyl carbamates and N - nitrosodimethylamine". Carcinogenesis, 16: 2467-2471, 1995.

⁵² K. Murakami, M. Ito, H.H. Htay, R. Tsubouchi, M. Yoshino. "Antioxidant effect of capsaicinoids on the metal-catalyzed lipid peroxidation". Biomedical Research-Tokyo, 22 (1): 15-17, 2001.

⁵³ A. Rosa, M. Deiana, V. Casu, S. Paccagnini, G. Appendino, M. Ballero, M.A. Dessì. "Antioxidant activity of capsinoids". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50 (25): 7396-7401, 2002.

⁵⁴ D.E. Henderson, S.K. Henderson. "Thermal decomposition of capsaicin. 1. Interactions with oleic acid at high temperatures". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40: 2263-2268, 1992.

A pesar de estas magníficas propiedades, el uso de los capsaicinoides como antioxidantes en alimentos o en tratamientos farmacéuticos está obviamente limitado por su marcado carácter picante y sus consiguientes propiedades molestas.

➤ **Analgésico tópico contra el dolor.**⁴⁶

Una de las propiedades fisiológicas más importantes de la capsaicina es su efecto selectivo sobre la zona periférica del sistema nervioso, particularmente sobre las neuronas aferentes primarias. La capsaicina tiene el efecto de reducir la transmisión del impulso nervioso de dolor, lo que la hace una herramienta muy versátil en el estudio de este mecanismo.

Por ello, la capsaicina es usada terapéuticamente como analgésico tópico para el tratamiento de ciertos dolores de tipo periférico como pueden ser la artritis reumatoide⁵⁶, la neuralgia post-herpética⁵⁷, neuropatías diabéticas⁵⁸ y osteoartritis entre otros.

Numerosas pruebas clínicas han revelado que el uso de cremas tópicas con un 0,025 % en capsaicina mejora significativamente el dolor en pacientes con artritis. Varias pomadas, cuyo ingrediente activo es la capsaicina o la oleorresina proveniente de los pimientos picantes, se comercializan en la actualidad.⁵⁹

➤ **Actividad anti-microbiana.**

Los capsaicinoides también se conocen por presentar unas marcadas propiedades anti-microbianas y anti-fúngicas. Cichewicz y colaboradores⁶⁰ comprobaron que los extractos obtenidos a partir de pimientos picantes inhibían el desarrollo de determinados patógenos como *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tetani* y *Streptococcus pyogenes*.

Molina-Torres y colaboradores⁶¹ encontraron que la capsaicina inhibía además el crecimiento y desarrollo de *Escherichia coli*, *Pseudomonas solanacearum* además de *Bacillus subtilis*.

También se ha demostrado que extractos de capsaicinoides presentan propiedades anti-bacterianas frente a *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa*⁶², y frente a *Helicobacter pylori*⁶³ entre otras.

⁵⁵ D.E. Henderson, A.M. Slickman. "Quantitative HPLC determination of the antioxidant activity of capsaicin on the formation of lipid hydroperoxides of linoleic acid. A comparative study against BHT and melatonin". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47: 2563-2570, 1999.

⁵⁶ V.H. Morris, S.C. Cruwys, B.L. Kidd. "Characterisation of capsaicin-induced mechanical hyperalgesia as a marker for altered nociceptive processing in patients with rheumatoid arthritis". Pain, 71: 179-186, 1997.

⁵⁷ G.C. Morris, S.J. Gibson, R.D. Helme. "Capsaicin-induced flare and vasodilatation in patients with postherpetic neuralgia". Pain, 63: 93-101, 1995.

⁵⁸ J. Bernstein, S. Phillips. "(838): Application of a topical medication containing high-dose capsaicin (0.25%) in a lidocaine-containing vehicle for treatment of painful diabetic neuropathy and postherpetic neuralgia". The Journal of Pain, 7: 60-60, 2006.

⁵⁹ E. Kaale, A.V. Schepdael, E. Roets, J. Hoogmartens. "Determination of capsaicinoids in topical cream by liquid-liquid extraction and liquid chromatography". Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 30: 1331-1337, 2002.

⁶⁰ R.H. Cichewicz, P.A. Thorpe. "The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine". Journal of Ethnopharmacology, 52: 61-70, 1996.

⁶¹ J. Molina-Torres, A. García-Chávez, E. Ramírez-Chávez. "Antimicrobial properties of alkamides present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: affinin and capsaicin". Journal of Ethnopharmacology, 64: 241-248, 1999

⁶² M. Careaga, E. Fernández, L. Dorantes, L. Mota, M.E. Jaramillo, H. Hernandez-Sanchez. "Antibacterial activity of *Capsicum* extract against *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beef meat". International Journal of Food Microbiology, 83: 331-335, 2003.

▪ **Otras aplicaciones.**

➤ Los capsaicinoides presentan importantes **propiedades anti-inflamatorias**. En la bibliografía se recogen numerosos artículos hablando de las propiedades anti-inflamatorias que presenta la capsaicina.⁶⁴

Hay estudios que indican que la capsaicina inhibe el desarrollo de procesos inflamatorios, al igual que mejora inflamaciones causadas en el estomago de ratas que han sido tratadas previamente con etanol.⁶⁵

➤ La capsaicina actúa como un **compuesto aleloquímico**, causando la inhibición del crecimiento de la raíz y brotes de la alfalfa (*Medicago sativa*), del berro (*Lepidium sativum*), de la lechuga (*Lactuca sativa*), del garranchuelo (*Digitaria sanguinalis*), de la hierba timotea (*Phleum pratense*) y de la avena loca (*Lolium multiflorum*), y suprime sus germinaciones⁶⁶. Un incremento de la dosis de capsaicina aumenta la inhibición.

En este estudio se concluyó en que la efectividad de la capsaicina en el crecimiento de las plantas difiere dependiendo de la especie y de la parte de la planta. Se sugiere además que la capsaicina puede actuar como un compuesto aleloquímico con otras plantas.

➤ La oleoresina proveniente de pimientos picantes es utilizada en **productos de autodefensa** como un arma no letal y de efectos inmediatos⁶⁷. Se calcula que cerca de 15 millones de americanos poseen algunos de estos productos de defensa personal. La exposición al spray de pimientos (capsaicinoides), produce respuestas fisiológicas muy intensas que se traducen en estornudos, desorientación, eritemas, lacrimación, ceguera temporal y un intenso dolor⁶⁸. Estos efectos que producen los spray de defensa son causados por los capsaicinoides (capsaicina, dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina, nonivamida, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina entre otros). Todos estos capsaicinoides se encuentran en las oleorresinas provenientes de los pimientos picantes.

Esta oleoresina es un extracto concentrado de pimientos picantes, y uno de sus usos es la preparación y fabricación de los spray de defensa. La capsaicina, dihidrocapsaicina y nonivamida son los capsaicinoides mayoritarios presentes en estos sprays, representando entre un 85 y un 95 % del total de capsaicinoides presentes en estos productos.

⁶³ D.Y. Graham, S.Y. Anderson, T. Lang. "Garlic or jalapeño peppers for treatment of *Helicobacter pylori* infection". *American Journal of Gastroenterology*, 94: 1200-1202, 1999.

⁶⁴ C.S. Kim, T. Kawada, B.S. Kim, I.S. Han, S.Y. Choe, T. Kurata, R. Yu. "Capsaicin exhibits anti-inflammatory property by inhibiting IκB-α degradation in LPS-stimulated peritoneal macrophages". *Cellular Signalling*, 15: 299-306, 2003.

⁶⁵ J.S. Park, M.A. Choi, B.S. Kim, I.S. Han, T. Murata, R. Yu. "Capsaicin protects against ethanol-induced oxidative injury in the gastric mucosa of rats". *Life Science*, 67: 3087-3093, 2000.

⁶⁶ H. Kato-Noguchi, Y. Tanaka. "Effects of capsaicin on plant growth". *Biologia Plantarum*, 47: 157-159, 2003.

⁶⁷ C.A. Reilly, D.J. Crouch, G.S. Yost, A.A. Fatah. "Determination of capsaicin, dihydrocapsaicin, and nonivamide in self-defense weapons by liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*, 912: 259-267, 2001.

⁶⁸ K. Hyder. "Is CS the wrong solution?". *New Scientist*, 149 (2023): 12-13, 1996.

➤ Los capsaicinoides son utilizados ampliamente como **repelentes de animales** frente a pájaros y mamíferos salvajes para la protección de huertos, semilleros, jardines y plantas ornamentales⁶⁹. En algunas partes del mundo se dan fenómenos de plagas de ciertos mamíferos como pueden ser los conejos en la zona oeste de los Estados Unidos. Bosland y Bosland⁷⁰ estudiaron el efecto de los capsaicinoides frente al daño de conejos salvajes en las plantaciones de lechuga. Observaron que en plantaciones que habían sido parte de las plantas tratadas con capsaicinoides, los conejos únicamente se comían aquellas plantas que no habían sido tratadas.

I. 3. 3. Evolución en el contenido en capsaicinoides durante la maduración y localización en la placenta.

Se han realizado una gran cantidad de estudios que presentan los cambios en el contenido de capsaicinoides que presentan las variedades picantes de pimientos a lo largo del desarrollo de la planta, maduración del fruto y durante su envejecimiento. Muchos de estos estudios están relacionados con la actividad de las peroxidasas, que son las enzimas que se presuponen que actúan en la degradación de estos compuestos⁷¹. Las peroxidasas catalizan la oxidación de un gran número de estructuras aromáticas.

La acumulación de capsaicinoides está especialmente asociada con el desarrollo de un órgano particular en estas plantas, que es el fruto.

Fujikawe y colaboradores⁷² determinaron que los capsaicinoides se biosintetizaban en las células de la placenta de los frutos de las variedades picantes del género *Capsicum*. Estos compuestos se producen a partir de la vía del ácido cinámico.

Iwai y colaboradores³⁸ fueron los primeros en sugerir que la producción de capsaicinoides incrementaba durante la maduración hasta un máximo, y a partir de ese máximo se producía un rápido vuelco en la tendencia, presentándose una degradación de estos compuestos superior al 60 %. También estudiaron la estructura celular de la placenta mediante un microscopio observando que se producían ciertos cambios morfológicos en el tejido epidérmico de la placenta durante la maduración. Parece ser por tanto que las células epidérmicas de la placenta son el lugar de acumulación de los capsaicinoides.

La pequeña cantidad de capsaicinoides detectada en el pericarpio del fruto y en las semillas se atribuye a la adherencia de pequeñas cantidades de capsaicinoides procedentes de la placenta. También se han encontrado capsaicinoides en otras partes de las plantas, como las hojas y el tallo, pero en mucha menor cantidad a la que se encuentra en la placenta.

⁶⁹ W.F. Andelt, K.P. Burnham, D.L. Baker. "Effectiveness of capsaicin and bitrex repellents for deterring browsing by captive mule deer". Journal of wildlife management, 58(2): 330-334, 1994.

⁷⁰ W.K. Bosland, P.W. Bosland. "Preliminary field tests of capsaicinoids to reduce lettuce damage by rabbits". Crop Protection, 20: 535-537, 2001.

⁷¹ M. Contreras-Padilla, E.M. Yahia. "Changes in capsaicinoids during development, maturation, and senescence of Chile peppers and relation with peroxidase activity". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46: 2075-2079, 1998.

⁷² H. Fujikawe, T. Susuki, K. Iwai. "Intracellular distribution of enzymes and intermediates involved in the biosynthesis of capsaicin and its analogs in *Capsicum* fruits". Agricultural and Biological Chemistry, 46: 2685-2689, 1982.

Bernal y colaboradores⁷³ realizaron estudios *in vitro* con peroxidasas y sugirieron que estas enzimas están envueltas en la degradación de los capsaicinoides. Estos mismos investigadores demostraron que las peroxidasas del pimiento eran las responsables de la oxidación de la capsaicina y de la dihidrocapsaicina⁷⁴. Se demostró además que la oxidación de la dihidrocapsaicina por medio de las peroxidasas del pimiento era estrictamente dependiente de la presencia de H₂O₂.

Estos mismos autores⁷⁵ comprobaron además que al igual que la capsaicina y los capsaicinoides, las peroxidasas del pimiento están principalmente localizadas en la placenta del pimiento y en los hilillos que salen de la placenta. Estos resultados fueron usados por estos autores como prueba de que son las peroxidasas las enzimas que están envueltas en la degradación de los capsaicinoides una vez que han alcanzado el máximo de concentración.

Contreras-Padilla y colaboradores⁷¹ realizaron un estudio sobre el cambio en el contenido de capsaicinoides durante el desarrollo, maduración y el envejecimiento de tres variedades de pimientos picantes en relación con la actividad de las peroxidasas. Las variedades estudiadas poseían una elevada pungencia. Estas variedades fueron Habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), De árbol (*Capsicum annuum* var. *Annuum*), y Piquin (*Capsicum annuum* var. *Aviculare*). El contenido en capsaicinoides era más abundante en los frutos del Habanero (200000 Unidades Scoville), seguido por Del árbol (150000 Unidades Scoville) y por último Piquin (60000 Unidades Scoville). El contenido en capsaicina era superior al contenido en dihidrocapsaicina en las tres variedades.

El contenido en capsaicinoides (capsaicina y dihidrocapsaicina) se incrementa continuamente y alcanza su pico máximo 45-50 días después de que aparezca el fruto en la variedad Habanero y De árbol y después de 40 días en el Piquin. Después de este tiempo, el contenido en capsaicinoides empieza a decaer. La actividad de las peroxidasas se incrementa al tiempo que la concentración de capsaicinoides decae. El incremento en el contenido en capsaicinoides siempre coincide con una disminución en la actividad de las peroxidasas. Por el contrario, la disminución en la concentración de los capsaicinoides siempre coincide con un elevado incremento de la actividad enzimática de las peroxidasas.

Estrada y colaboradores¹⁴ realizaron un estudio sobre la evolución del contenido en capsaicinoides, ácidos fenólicos y lignina a lo largo de la maduración en pimientos del tipo *Capsicum annuum* cv. Padrón. Los capsaicinoides eran detectados 14 días después de la floración, en el primer estado de crecimiento del fruto. Este nivel bajo en capsaicinoides se mantenía durante unos días, pero ya en el día 28 tras la floración, se observaba un incremento moderado en la cantidad de capsaicinoides. Finalmente en los últimos estados del desarrollo del fruto, sobre el día 42 tras la floración, los pimientos presentaban un elevado aumento en el contenido en capsaicinoides. El nivel de capsaicinoides en este tipo de pimientos es inferior que en otras muchas variedades, pero el modelo de acumulación es similar.⁷¹

⁷³ M.A. Bernal, A.A. Calderón, M.A. Pedreño, R. Muñoz, A. Ros Barceló, F. Merino. "Capsaicin oxidation by peroxidase from *Capsicum annuum* (Var. *annuum*) fruits". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 41: 1041-1044, 1993.

⁷⁴ M.A. Bernal, A.A. Calderón, M.A. Pedreño, R. Muñoz, A. Ros Barceló, F.C. Merino. "Dihydrocapsaicin oxidation by *Capsicum annuum* (var. *annuum*) peroxidase". Journal of Food Science, 58: 611-613, 1993.

⁷⁵ M.A. Bernal, A.A. Calderón, M.A. Pedreño, M.A. Ferrer, F.C. Merino, A. Ros Barceló. "A purification of a basic peroxidase isoenzyme from *Capsicum* fruits and the immunoinhibition of its capsaicin oxidation capacity by antibodies raised against horseradish peroxidase". Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung A-Food Research and Technology, 199: 240-242, 1994.

Estos mismos autores estudiaron la evolución de los ácidos fenólicos libres predominantes en el pimiento de Padrón (ác. protocatéquico, ác. clorogénico, ác. cumárico y ác. ferúlico). En estos ácidos se han encontrado diferencias, asociadas con los sucesivos estados de desarrollo del fruto.

El modelo de acumulación de estos ácidos es muy diferente al que presentan los capsaicinoides, y sus niveles son mucho mayores en los primeros estados de desarrollo del fruto que al final del proceso de maduración. Todos estos ácidos presentan una disminución de concentración conforme transcurre el proceso de maduración, salvo el ácido ferúlico, el cual es precursor de los capsaicinoides y solo aparece en el último estado de la maduración. Se concluyó que la disminución en el contenido de ácidos fenólicos podría estar relacionada con la síntesis de capsaicinoides (figura 9).

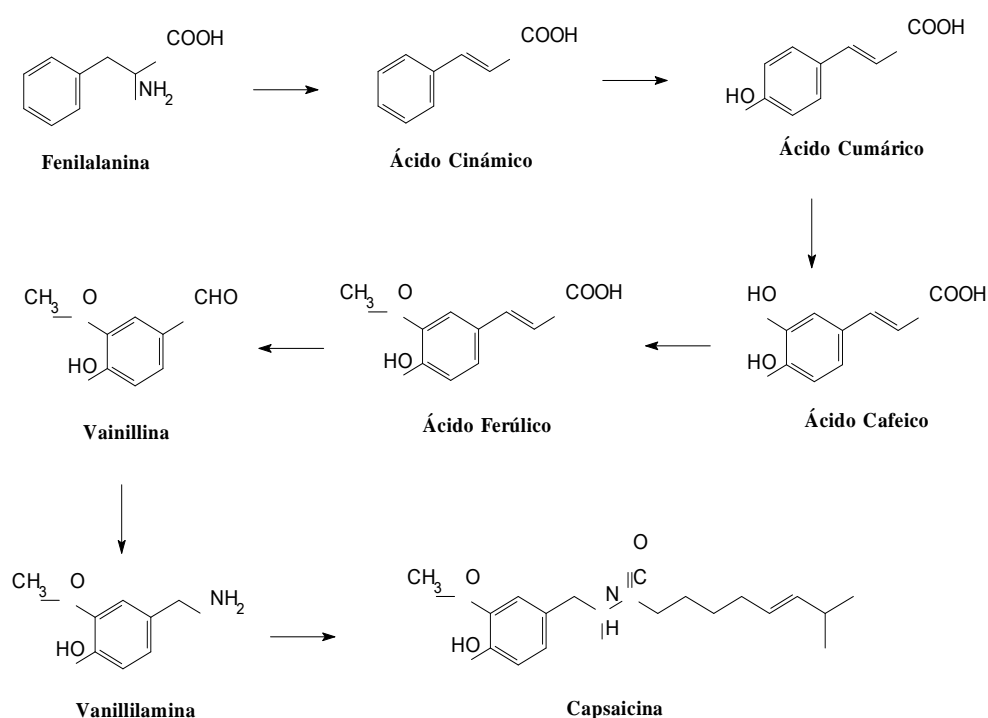


Figura 9: Biosíntesis de la capsaicina.

Estrada y colaboradores⁷⁶ estudiaron y relacionaron el contenido en capsaicinoides y compuestos fenólicos en diferentes estados de maduración del pimiento. Observaron que la capsaicina, la dihidrocapsaicina y la nordihidrocapsaicina presentaban el mismo patrón de acumulación en todos los estados, pero la homodihidrocapsaicina solo aparecía en los últimos estados de maduración del fruto.

⁷⁶ B. Estrada, M.A. Bernal, F. Pomar, F. Merino. "Identification and quantification of some capsaicinoids in Padrón pepper (*Capsicum annuum* L. var. *annuum*) fruits". Acta Alimentaria, 30: 373-380, 2001.

Estrada y colaboradores⁴⁰ estudiaron la composición de los capsaicinoides en distintos órganos de la planta del pimiento en relación con el periodo de maduración de la misma. Hicieron el estudio con plantas del tipo *Capsicum annuum* cv. Padrón. Observaron que las plantas presentaban un gradiente espacial en el contenido de compuestos fenólicos, y particularmente en el contenido en capsaicinoides, a lo largo del tallo de la planta. El contenido en capsaicinoides era más abundante en aquellos frutos pertenecientes a las partes altas de las plantas, que en aquellos que estaban en la parte baja o en la parte media de la misma. Analizaron el contenido de capsaicina y de dihidrocapsaicina, los dos capsaicinoides más abundantes de los pimientos, comprobando que la proporción de capsaicina era siempre superior a la proporción de dihidrocapsaicina en los frutos.

En este estudio comprobaron que los capsaicinoides estaban presentes en todos los órganos de la planta, como el tallo y las hojas. Tanto en el tallo como en las hojas, la proporción individual de capsaicinoides (capsaicina y dihidrocapsaicina) era diferente a la que presentan los frutos, siendo en estas partes de la planta la dihidrocapsaicina el capsaicinoide más abundante. Para comprobar si los capsaicinoides presentes en las hojas y en el tallo procedían de los frutos se realizó un estudio que consistía en eliminar las flores de las plantas, con lo que se impedía la formación del fruto. De esta forma no se encontraron capsaicinoides ni en el tallo ni en las hojas de las plantas, por lo que se sugiere que los capsaicinoides se generan únicamente en el fruto.

Kirschbaum-Titze y colaboradores⁷⁷ realizaron un estudio sobre el contenido en capsaicinoides de frutos individuales provenientes de la misma planta y recolectados al mismo tiempo tras la floración. Estos frutos poseían un amplio rango de valores, pero presentando un modelo bastante uniforme en la relación existente entre los distintos capsaicinoides estudiados (capsaicina, dihidrocapsaicina y nordihidrocapsaicina). Comprobaron que se producían cambios en el contenido de capsaicinoides dependiendo de la época en el que se recogiera el fruto, transcurrido el mismo tiempo después de la floración dentro de los frutos de una misma planta. Se observa que el contenido en capsaicinoides de los pimientos recolectados entre junio y septiembre es mayor que el de los pimientos recolectados en octubre.

Estrada y colaboradores⁴² estudiaron la cantidad de capsaicinoides, compuestos fenólicos solubles y contenido en lignina presentes en plantas de pimientos de Padrón (*Capsicum annuum* L. var. *annuum*) cultivadas con dos formas diferentes de fertilización. El nivel de fertilización no influyó en el crecimiento de las plantas. Se observó que el contenido en compuestos fenólicos libres y en lignina era superior en las plantas control (sin aporte complementario de fertilizantes minerales), que en aquellas que habían sido tratadas. Por el contrario, las plantas tratadas con un aporte suplementario de nutrientes minerales presentaban bastante mayor cantidad de capsaicinoides que aquellas que no habían sido tratadas. Se concluyó que la fertilización de las plantas alteraba el balance entre la síntesis de capsaicinoides por la planta y la acumulación de ligninas en las paredes celulares.

Estos mismos autores estudiaron la cantidad de capsaicinoides sintetizados en plantas de pimientos tipo Padrón (*Capsicum annuum* L. var. *annuum*) que habían sido cultivadas con distintos aportes de agua. La cantidad de capsaicinoides (capsaicina y

⁷⁷ P. Kirschbaum-Titze, C. Hiepler, E. Mueller-Seitz, M. Petz. "Pungency in Paprika (*Capsicum annuum*). 1. Decrease of capsaicinoid content following cellular disruption". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 1264-1266, 2002.

dihidrocapsaicina) en los pimientos procedentes de plantas con una deficiencia hídrica era superior que la de los pimientos procedentes de plantas control. Este aumento en el contenido en capsaicinoides se observaba especialmente en aquellas plantas que habían sufrido un mayor estrés hídrico. Los resultados de este experimento sugieren que las condiciones medioambientales, como puede ser el estrés hídrico, tienen un marcado efecto en la acumulación de los capsaicinoides en los pimientos.⁴¹

La heterogeneidad en el contenido en capsaicinoides entre frutos provenientes de plantas cultivadas en las mismas condiciones, o incluso entre frutos individuales recolectados de la misma planta con el mismo tiempo de maduración, conlleva que existen otros factores implicados, además de los genéticos, en la biosíntesis de los capsaicinoides, habiéndose demostrado que las condiciones ambientales influyen en el contenido en capsaicinoides.⁷⁸

⁷⁸ K.P. Harvell, P.W. Bosland. "The environmental produces a significant effect on pungency of chiles". HortScience, 32: 1292-1292, 1997.

I. 4. CAPSINOIDES.

I. 4. 1. Características generales.

Los **capsinoides** también llamados “**Capsaicinoid-like substances (CLS)**”, por su semejanza con los capsaicinoides, son compuestos naturales que se encuentran en algunas variedades de pimientos dulces. Su máximo interés reside en la demostrada actividad biológica que exhiben. El interés de los capsinoides es tan alto que ya se ha registrado su patente con posibles usos en bebidas “saludables” del capsiato y del nordihidrocapsiato⁷⁹, además de su uso en analgésicos y en alimentos⁸⁰. Por todo ello es especialmente interesante la búsqueda de nuevos compuestos de estructuras similares y de mayor actividad biológica y la elaboración de métodos rápidos y reproducibles de análisis de los mismos.

En los trabajos publicados hasta la actualidad en relación con el análisis de capsaicinoides y capsinoides, se encuentran picos cromatográficos correspondientes a compuestos no identificados. Entre éstos se encuentran compuestos que deben poseer estructuras parecidas, puesto que presentan similares propiedades espectroscópicas.

Hay que destacar que debido a lo reciente de la identificación del primer capsinoides, todos los métodos analíticos disponibles actualmente se refieren al análisis de capsaicinoides. Debido a que sus estructuras y propiedades son muy similares se pueden tomar estos métodos como punto de partida para el análisis de capsinoides.

Los capsinoides químicamente son ésteres formados a partir de la condensación del alcohol vanílico y ácidos grasos similares a los que intervenían en la formación de los capsaicinoides. La única diferencia estructural que presentan los capsinoides con respecto a los capsaicinoides es el tipo de enlace que presenta el esqueleto bencénico con la cadena carbonada de la molécula. En los capsinoides este enlace es tipo éster, mientras que en los capsaicinoides el enlace es tipo amida. La principal diferencia sensorial que presentan estas dos familias de compuestos es que mientras los capsaicinoides presentan unas marcadas características picantes, los capsinoides no presentan de ninguna manera estas propiedades picantes. A pesar de esta diferencia, los capsinoides presentan muchas funciones fisiológicas similares a los capsaicinoides, causando una estimulación mucho menos dañina de la que causan éstos últimos. Por lo tanto el que no presenten estas características picantes, les hace muy útiles para un amplio uso tanto en alimentación como en medicina.

Los capsinoides se descubrieron en los frutos de la planta no picante *Capsicum annuum L.*, a la que se llamó “CH-19 Sweet”,²³ la cual contenía solo una pequeña cantidad de capsaicinoides pero por el contrario, cantidades considerables de capsinoides.

⁷⁹ S. Yazawa, T. Watanabe, T. Fushiki, K. Kobata, M. Imai, Y. Setoguchi, S. Hashizume. “Novel capsaicinoid-like substances having esters bond for health food”. PCT Int Appl. WO9944981 A1 (10/09/99).

⁸⁰ M. Kato, H. Setoguchi, S. Hashizume, M. Imai, S. Yazawa, T. Fushiki, T. Watanabe, K. Furuhashi. “Analgésicos, alimentos, y alimentos que contienen capsaicinoides-like substances”. Patente: JP: 2001158738 A2.

Posteriormente se identificaron los dos capsinoides mayoritarios en los pimientos,⁸¹ el capsiato y dihidrocapsiato, que químicamente se pueden nombrar como [(*E*)-8-metil-6-nonenoato de 4-hidroxi-3-metoxibenzilo] y [8-metil-6-nonanoato de 4-hidroxi-3-metoxibenzilo] respectivamente.

El esqueleto base de los capsinoides tiene la siguiente estructura:

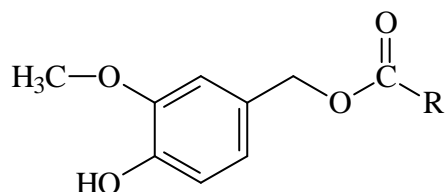


Figura 10: Estructura base de los capsinoides.

Al igual que ocurría con los capsaicinoides, dependiendo del número de carbonos de la cadena lateral (R) o de si poseen o no insaturaciones podemos tener los distintos capsinoides que se conocen, tal como se representa en la tabla 4.

R =	NOMBRE
	Capsiato
	Dihidrocapsiato
	Nordihidrocapsiato

Tabla 4: Cadenas laterales que presentan los capsinoides naturales conocidos.

La cadena carbonada del capsiato y del dihidrocapsiato son las mismas que en la capsaicina y la dihidrocapsaicina respectivamente, diferenciándose tan solo en la porción aromática, la cual no es la vanillilamina como en los capsaicinoides, sino el alcohol vanílico.

Posteriormente se han determinado por métodos espectroscópicos las estructuras de otros capsinoides presentes en algunas variedades de pimientos dulces como el

⁸¹ K. Kobata, T. Todo, S. Yazawa, K. Iwai, T. Watanabe. "Novel capsaicinoid-like substances, capsiate and dihydrocapsiate, from the fruits of a nonpungent cultivar, CH-19 sweet, of pepper (*Capsicum annuum* L.)". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46: 1695-1697, 1998.

nordihidrocapsiato⁸², que se puede nombrar como 7-metiloctanoato de 4-hidroxi-3-metoxibenzilo.

I. 4. 2. Efectos y aplicaciones de los capsinoides.

La medicina alternativa a la hora de tratar enfermedades inflamatorias se está convirtiendo en una terapia muy utilizada y eficaz, la cual está basada principalmente en conocimientos de etnobotánica. Algunos compuestos naturales provenientes de plantas medicinales, como pueden ser los capsinoides presentan estas propiedades. En este sentido, el uso de derivados alimenticios que tienen la ventaja de ser relativamente no tóxicos, representan una fuente segura e interesante de nuevos compuestos que permitan el desarrollo de nuevos fármacos.

Considerando el uso tan extendido que tiene el pimiento en la alimentación, así como la presencia de capsinoides presentes en determinadas variedades de pimientos, hace que estos compuestos posean por tanto una evidente relevancia nutricional.

Algunas de las propiedades fisiológicas que se han estudiado para los capsinoides han sido:

➤ Presentan actividad antioxidante.

Como se sabe desde hace tiempo, los capsaicinoides presentan unas marcadas propiedades antioxidantes⁵², pero su uso como antioxidantes tanto en alimentación como en productos farmacéuticos queda muy limitado debido al marcado carácter picante que presentan. En cambio, los capsinoides son inofensivos y carecen de características picantes. Sin embargo se comprobó que compartían otras muchas actividades biológicas con los capsaicinoides.

Por ejemplo, los capsinoides aumentan la secreción adrenal de catecolaminas al igual que la capsaicina. Tanto la capsaicina como el capsiato producen un incremento en la temperatura corporal y estudios recientes sugieren que el capsiato puede promover el metabolismo energético y suprimir la acumulación de grasas en el organismo de la misma manera en que lo hace la capsaicina.⁸³

Todos estos datos han inducido a estudiar la actividad antioxidante de los capsinoides en varios modelos de oxidación lipídica⁵³. Para ello se han estudiado las propiedades antioxidantes del capsiato, dihidrocapsiato, un análogo sintético llamado nonanoato de vanillilo [nonanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo] y el dímero de éste último. La actividad de estos compuestos fue comparada con la que presenta el α -tocoferol, la luteolina (ambos presentes en los pimientos) y el antioxidante sintético BHT.

⁸² K. Kobata, K. Sutoh, T. Todo, S. Yazawa, K. Iwai, T. Watanabe. "Nordihydrocapsiate, a new capsaicinoid from the fruits of a nonpungent pepper, *Capsicum annuum* L". Journal of Natural Products, 62 : 335-336, 1999.

⁸³ Y. Tani, T. Fujioka, M. Sumioka, Y. Furuichi, H. Hamada, T. Watanabe. "Effects of capsinoid on serum and liver lipids in hyperlipidemic rats". Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 50, 351-355, 2004.

Se ha investigado la inhibición de la peroxidación lipídica en dos sistemas “in vitro”, los cuales han sido la auto-oxidación y la oxidación del ácido oleico catalizada por cationes Fe^{3+} o por AEDT a 37 °C en ausencia de disolventes.

Se comprobó que todos estos compuestos fueron activos, a pesar de que algunos presentaron mejores propiedades antioxidantes que otros. Durante la oxidación del ácido linoleico, el capsiato y el dímero del nonanoato de vanillilo presentaron una elevada actividad antioxidante, comparable a la que ejercen antioxidantes como la luteolina o el α -tocoferol. Bajo las mismas condiciones, el dihidrocapsiato y el nonanoato de vanillilo fueron menos efectivos que los anteriores, aunque presentan claras propiedades antioxidantes.

Durante la oxidación del ácido linoleico catalizada por cationes Fe^{3+} , los 4 capsinoides estudiados presentaron una actividad notable en la protección del ácido linoleico frente al ataque de radicales libres, incluso bastante superior a la que presentaban la luteolina y el α -tocoferol, los cuales son activos solamente a altas concentraciones.

Todos los capsinoides estudiados y sus análogos han demostrado un elevado poder como antioxidantes. Este efecto es debido a su capacidad para donar átomos de hidrógeno y deslocalizar el radical libre que se forma.

Por lo tanto se ha comprobado que tanto el capsiato como el dihidrocapsiato poseen una actividad antioxidante comparable a la que presentan sus correspondientes capsainoides (capsaicina y dihidrocapsaicina). La diferencia está en que tanto el capsiato como el dihidrocapsiato no presentan las propiedades picantes que presentan los capsainoides, lo que los hace ser compuestos muy interesantes para ser utilizados como antioxidantes en la alimentación.

➤ **Compuestos quimiopreventivos y anticancerígenos.⁸⁴**

Se ha demostrado que la capsaicina induce apoptosis en celular tumorales por la activación de los receptores vanilloides tipo 1(VR1). Las propiedades quimiopreventivas y antitumorales que presenta la capsaicina son anuladas en gran medida por su marcado carácter irritante. La capsaicina puede inducir fácilmente la muerte celular en células con receptores vanilloides tipo 1(VR1). Esta muerte celular ocurre rápidamente, incluso con concentraciones de capsaicina incapaces de inducir apoptosis en células tumorales que no poseen receptores específicos tipo 1(VR1). Por ello la aplicación terapéutica de la capsaicina esta restringida en este sentido, ya que produciría la muerte celular tanto de las células tumorales como de las sanas.

Debido a la similitud estructural de los capsinoides con los capsainoides, se han realizado estudios posteriores sobre los efectos de los capsinoides en la generación de especies oxígenas reactivas y en la inducción de apoptosis en células tumorales⁸⁵.

⁸⁴A. Macho, R. Sancho, A. Minassi, G Appendino, A. Lawen, E. Muñoz. “*Involvement of reactive oxygen species in capsaicinoid-induced apoptosis in transformed cells*”. Free Radical Research 37: 611-619, 2003.

⁸⁵A. Macho, C. Lucena, R. Sancho, N. Daddario, A. Minassi, E. Muñoz, G. Appendino. “*Non-pungent capsainoids from sweet pepper. Synthesis and evaluation of the chemopreventive and anticancer potential*”. European Journal of Nutrition, 42: 2-9, 2003.

Los capsinoides no son capaces de activar los receptores vanilloides tipo 1 (VR1) como lo hacen los capsaicinoides, lo cual está relacionado con la ausencia del carácter picante en estos compuestos. Por el contrario, estos compuestos retienen la capacidad de inducir apoptosis en células tumorales incluso en una mayor extensión a como lo puedan hacer los capsaicinoides en general o la capsaicina en particular, lo cual les abre unas enormes posibilidades de aplicaciones farmacéuticas que no tienen los capsaicinoides.

Se ha comprobado que los capsinoides inducen apoptosis en células tumorales mediante un incremento en la producción de especies oxigenas reactivas con la consiguiente perdida del potencial de la membrana mitocondrial de las células tumorales, lo cual produce la muerte celular. Además los capsinoides son incapaces de producir la muerte celular en células normales a las concentraciones en las que son usados para matar las células tumorales.

Este estudio se ha realizado con ratones hembra. A estos ratones se les aplicaba tópicamente una cierta cantidad de un compuesto cancerígeno (dimetilbenzo[α]antraceno como iniciador además de un promotor). Una semana después a un cierto grupo de estos ratones se les empezaba a aplicar el nordihidrocapsiato. Los ratones eran pesados semanalmente y se les contaba el número de tumores visibles una vez por semana.

Durante los 119 días del estudio se observó que la totalidad de los ratones presentaban papilomas en la piel, incrementándose su número progresivamente a medida que se desarrollaba el estudio. La media de los papilomas en los ratones de control al final del estudio fue de 29,6 papilomas por animal. Por el contrario, en los ratones tratados con nordihidrocapsiato, la presencia de papilomas se reducía a la mitad (15,2 tumores por animal) y además se retrasaba su aparición así como el tamaño de éstos.

Estos ensayos han dado muy buenos resultados con capsinoides concretos como puede ser el nordihidrocapsiato, el cual presenta una potente actividad quimiopreventiva. Se ha demostrado que los efectos producidos por estos compuestos dependen de la dosis aplicada, presentando el nordihidrocapsiato mayor actividad biológica que la capsaicina.

Todos estos resultados nos sugieren que los capsinoides y los compuestos sintéticos análogos actúan en diversos procesos relacionados con el desarrollo del cáncer y la inflamación, teniendo un enorme potencial en las dietas, pudiendo producir grandes beneficios para la salud, así como abrir nuevos campos en el desarrollo de fármacos.

➤ **Promueven el metabolismo energético y suprimen la acumulación de grasas en el organismo.**⁸⁶

Se han realizado estudios sobre el efecto de la administración oral del capsiato en la termogénesis y acumulación de grasas en ratas. Para ello se les administró a las ratas cantidades de 10 mg, tanto de capsaicina como de capsiato, por kilogramo de peso del animal. Se observa un aumento en el consumo de oxígeno y en la concentración de

⁸⁶ K. Ohnuki, S. Haramizu, K. Oki, T. Watanabe, S. Yazawa, T. Fushiki. "Administration of capsiate, a non-pungent capsaicin analog, promotes energy metabolism and suppresses body fat accumulation in mice". *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 65 : 2735-2740, 2001.

adrenalina en el suero en las ratas a las que se les administró la capsaicina y el capsiato, con respecto a aquellas a las que no se les administró.

También se han realizado estudios sobre el efecto que se produce en dos semanas al administrar capsaicina y capsiato en la acumulación corporal de grasas en las ratas. Cada día durante dos semanas se administraba a las ratas cantidades de capsiato de 10 mg por kilogramo de peso de la rata. Se observó que había una marcada disminución en la acumulación de grasas en el cuerpo, similar a la que se produce con la misma administración de capsaicina.

Todos estos resultados sugieren que el capsiato promueve el metabolismo energético y suprime la acumulación de grasas en el cuerpo del mismo modo a como lo hace la capsaicina.

➤ **Aumentan la temperatura corporal y el consumo de oxígeno en los humanos.**^{87,88}

Se ha investigado el efecto que provoca el consumo de pimientos “CH-19 Sweet”, pimiento donde se han encontrado los capsinoides, en la temperatura corporal y en el consumo de oxígeno en humanos.

Ohnuki y colaboradores⁸⁹ han estudiado previamente el efecto que provoca la administración del pimiento “CH-19 Sweet” y del capsiato en el incremento de la temperatura corporal en ratones. Este estudio demostró que la temperatura de aquellos ratones a los que se les administró el pimiento “CH-19 Sweet” o el capsiato era significativamente superior a la de aquellos ratones a los que se les administró pimientos sin capsinoides u otras sustancias de control distintas a los capsinoides.

En los estudios con humanos, se dio de comer a 11 voluntarios sanos este tipo de pimientos, y posteriormente se les midió la temperatura corporal y el consumo de oxígeno que presentaban. El grupo de control consumió un tipo de pimiento denominado “*California-Wandar*”, los cuales no contenían ni capsaicinoides ni capsinoides.

Como resultado se observó que la temperatura corporal de las personas que habían consumido el pimiento “CH-19 Sweet” era significativamente superior que las del grupo de control. Se comprobó además que la temperatura corporal se incrementaba durante unos 20 minutos después del consumo del pimiento “CH-19 Sweet”.

También se realizaron estudios del gas expirado mediante procedimientos calorimétricos indirectos, mientras los sujetos llevaban mascarillas en la cara. Se observaron también diferencias significativas en el consumo de oxígeno, encontrándose valores significativamente más altos en aquellas personas que habían consumido pimientos “CH-19 Sweet” frente a las del grupo de control.

⁸⁷ S. Yazawa, S. Niwa, T. Watanabe, T. Fushiki. “*Biosynthesis of capsaicinoids-like substances in Capsicum fruits and their physical activities in the human body*”. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 67: 296-304, 1998.

⁸⁸ K. Ohnuki, S. Niwa, S. Maeda, N. Inoue, S. Yazawa, T. Fushiki. “*CH-19 Sweet, a non-pungent cultivar of red pepper, increased body temperature and oxygen consumption in humans*”. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 65: 2033-2036, 2001.

⁸⁹ K. Onuki, S. Haramizu, T. Watanabe, S. Yazawa, T. Fushiki. “*CH-19 Sweet, nonpungent cultivar of red pepper, increased body temperature in mice with vanilloid receptors stimulation by capsiato*”. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 47: 295-298, 2001.

Todos estos resultados sugieren que el pimiento “CH-19 Sweet” (supuestamente los capsinoides presentes en él) incrementan la temperatura corporal y el consumo de energía en los humanos

➤ **Son unos potentes compuestos anti-inflamatorios “*in vivo*”.**⁹⁰

Como se sabe desde hace tiempo, la capsaicina posee unas magnificas propiedades anti-inflamatorias. A pesar de ello, su uso queda restringido debido al marcado carácter picante e irritante que posee dicha sustancia.

Estudios realizados con capsinoides como el dihidrocapsiato han demostrado que estos compuestos presentan también propiedades anti-inflamatorias muy marcadas, teniendo estos compuestos la ventaja de no ser picantes ni irritantes, lo que les hace susceptibles de ser aplicados en mucha mayor medida de la que puedan ser aplicados los capsaicinoides.

Se sabe que la capsaicina es capaz de inhibir la activación del factor de transcripción NF-κB. El factor de transcripción NF-κB es una de las llaves reguladoras de los genes responsables de las respuestas inmunes y de las respuestas anti-inflamatorias en el organismo. El factor NF-κB es fuertemente activado en los órganos inflamados en diversas enfermedades.

Se ha demostrado también que el nordihidrocapsiato inhibe la activación del factor de transcripción NF-κB al igual que lo hace la capsaicina, con la ventaja de que no produce los efectos adversos que produce la capsaicina por su carácter picante e irritante.

Se han realizado estudios con el nordihidrocapsiato, presentando éste dos mecanismos de actuación diferentes ante los procesos inflamatorios. Por un lado se ha demostrado que un pretratamiento intraperitoneal con dihidrocapsiato previene a los ratones de shocks sépticos letales inducidos por lipopolisacáridos.

Por otro lado, un pretratamiento con nordihidrocapsiato en ratones reduce en gran medida daños severos en el epitelio glandular observados en el intestino de ratones.

A la vista de estos resultados, lo que se sugiere es que el dihidrocapsiato y otros compuestos análogos relacionados como el capsiato o el dihidrocapsiato, actúan en caminos específicos que involucran a los procesos inflamatorios, y poseen un considerable potencial para las dietas funcionales, pudiéndose utilizar además para el desarrollo de nuevos fármacos.

Por todo ello, los capsinoides presentan un enorme potencial en el uso en dietas saludables así como en su utilización en fármacos.

⁹⁰ R. Sancho, C. Lucena, A. Macho, M.A. Calzado, M. Blanco-Molina, A. Minassi, G. Appendino, E. Muñoz. “Immunosuppressive activity of capsaicinoids: capsiate derived from sweet peeppers inhibits NF-κB activation and is a potent antiinflammatory compound *in vivo*”. European Journal of Immunology, 32: 1753-1763, 2002.

I. 5. ANÁLISIS DE CAPSAICINOIDES EN PIMIENTOS.

I. 5. 1. Técnicas de extracción de capsaicinoides en pimientos.

▪ Generalidades.

En los últimos años el análisis rápido y exacto del contenido en capsaicinoides en determinadas muestras, ha cobrado una relevante importancia debido a la creciente demanda por parte de los consumidores de alimentos elaborados a partir de pimientos picantes, así como el incremento de su uso con fines farmacéuticos entre otros.

El aislamiento de capsaicinoides de la matriz de la muestra, generalmente pimientos, aunque en ocasiones se puede tratar de fluidos biológicos, sprays de defensa⁹¹ o compuestos farmacéuticos⁵⁹ entre otros, es generalmente un requisito previo para cualquier proceso de análisis.

La preparación de las muestras para los posteriores estudios analíticos que determinan la composición de los capsaicinoides, en matrices vegetales habitualmente, consiste en varias etapas, que van desde la extracción de estos compuestos utilizando diversas técnicas, pasando por etapas de preconcentración y filtrado de las muestras.

La extracción propiamente dicha envuelve la separación de compuestos de interés, que deseamos cuantificar y analizar, de aquellos presentes en la matriz de la muestra que no nos interesan, a partir de la utilización de un disolvente seleccionado y de un proceso de extracción adecuado. En cada extracción se obtiene un complejo sistema de sustancias activas que puede contener sustancias lastres de diferente procedencia. Se puede definir por tanto a la extracción como la separación de una mezcla de sustancias por disolución de cada componente, sirviéndose de uno o varios disolventes, donde siempre se obtienen, por lo menos, dos componentes: la solución extraída en su disolvente (extracto) y el residuo.

En cuanto a la extracción de capsaicinoides en pimientos han sido muchos los métodos desarrollados. Las extracciones son llevadas a cabo empleando disolventes orgánicos como metanol,^{92,93} etanol,^{94,95} acetonitrilo,^{14,41,71,92} acetona,^{92,96,97,98} acetato de etilo,^{99,81,100,101} cloroformo¹⁰² o bien mezcla de estos como pueden ser mezclas acetona-éter etílico.³⁹

⁹¹ O. Spicer, J.R. Almirall. "Extraction of capsaicins in aerosol defense sprays from fabrics". *Talanta*, 67: 377-382, 2005.

⁹² R. Karnka, M. Rayanakorn, S. Watanesk, Y.Vaneesorn. "Optimization of high-performance liquid chromatographic parameters for the determination of capsaicinoids compounds using the simplex method". *Analytical Sciences*, 18: 661-665, 2002.

⁹³ P. Kirschbaum-Titze, C. Hiepler, E. Mueller-Seitz, M. Petz. "Pungency in Paprika (*Capsicum annum*) 1. Decrease of capsaicinoid content following cellular disruption". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (5): 1260-1263, 2002.

⁹⁴ L. Boyadzhiev, D. Kancheva, P. Guiraud, P. Gourdon. "On carotenoids and capsaicin extraction from red paprika (*Capsicum annum* L.) fruits". *Hungarian Journal of Industrial Chemistry*, 27: 37-41, 1999.

⁹⁵ E.S. Poyrazoglu, O. Yemis, C. Kadacal, N. Artic. "Determination of capsaicinoid profile of different chilli peppers grown in Turkey". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 1435-1438, 2005.

⁹⁶ B.V. Thomas, A.A. Schreiber, C.P. Weisskopf. "Simple method for quantitation of capsaicinoids in peppers using capillary gas chromatography". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 2655-2663, 1998.

⁹⁷ F. Korel, N. Bagdatlioglu, M.Ö. Balaban, Y. Hisil. "Ground red peppers: capsaicinoids content, scoville scores, and discrimination by an electronic nose". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3257-3261, 2002.

⁹⁸ W.S. Hawer, J.H. Ha, J.B. Hwang, Y.J. Nam. "Effective separation and quantitative-analysis of major heat principles in red-pepper by capillary gas-chromatography". *Food Chemistry*, 49: 99-103, 1994.

⁹⁹ T. Suzuki, T. Kawada, K. Iwai. "Effective separation of capsaicin and its analogues by reversed-phase high-performance thin-layer chromatography". *Journal of Chromatography A*, 198: 217-223, 1980.

▪ **Preparación de la muestra para la extracción.**

Muchos son los métodos que se encuentran en la bibliografía para la preparación de las muestras previa a la extracción en el caso de los frutos. Generalmente al pimiento se le quita el pezón y las pepitas para su análisis,^{39,81,92,96} analizándose únicamente el pimiento propiamente dicho o la placenta, bien juntos o por separado.

Los pimientos pueden someterse a métodos de extracción, frescos, o una vez que han sido secados en hornos de aire caliente a determinadas temperaturas o también liofilizados¹⁰². También se han realizado extracciones de capsaicinoides en fluidos biológicos o en formulaciones farmacéuticas como pueden ser cremas o pomadas utilizadas tópicamente para el tratamiento del dolor.

Antes de realizar la extracción de la muestra de pimientos, ya sea la muestra fresca, seca o liofilizada, se la somete a un procedimiento de triturado o molienda, para obtener una muestra homogénea y con una elevada superficie de contacto para que el disolvente que se utilice pueda tener una mayor accesibilidad. Este procedimiento de triturado o molienda suele hacerse normalmente con molinillos convencionales.

Extracción de pimientos frescos: Diversos autores han realizado las extracciones a las muestras frescas de pimientos trituradas^{39,93,96}. Simplemente se trata de separar el pimiento propiamente dicho y la placenta de las pepitas y del pezón del pimiento. Una vez quitadas las pepitas y el pezón se tritura la placenta y el pimiento, bien juntos o por separado, dependiendo del tipo de análisis que se desee realizar. Este triturado será la muestra que se utilice en la extracción para la determinación de capsaicinoides.

Extracción de pimientos secos: Diversos autores han desarrollado métodos de extracción de capsaicinoides a partir de pimientos que han sido secados previamente^{14,71,103,92}. Karnka y colaboradores⁹² desarrollaron un método en el que secaban las muestras de pimientos en un horno de aire caliente a la temperatura de 55 °C por un periodo de tiempo comprendido entre 24 y 30 horas. Contreras-Padilla y colaboradores⁷¹ secaban las muestras de pimientos en un horno a temperatura de 60 °C hasta que el peso se mantenía constante. Este mismo procedimiento lo han empleado Estrada y colaboradores⁴⁰, manteniendo los pimientos en el horno a 60 °C durante 2 a 5 días hasta que el peso se mantenía constante.

Extracción de pimientos liofilizados: Kobata y colaboradores⁸¹ han desarrollado un método de extracción de pimientos liofilizados para la determinación de capsaicinoides. Partían de 1 Kg de pimientos frescos a los cuales se les habían quitado previamente el

¹⁰⁰ K. Iwai, T. Suzuki, H. Fujiwake. "Simultaneous microdetermination of capsaicin and its four analogues by using high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry". Journal of Chromatography A, 172: 303-311, 1979.

¹⁰¹ B.J. Rowland, B. Villalon, E.E. Burns. "Capsaicin production in sweet bell and pungent Jalapeño peppers". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 31: 484-487, 1983.

¹⁰² V.K. Attuquayefio, K.A. Buckle. "Rapid sample preparation method for HPLC analysis of capsaicinoids in capsicum fruits and oleoresins". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 35: 777-779, 1987.

¹⁰³ A.A. Gbolade, O.R. Omobuwajo, R.O. Soremekun. "Evaluation of the quality of Nigerian chillies for pharmaceutical formulations". Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 15: 545-548, 1997.

pezón y las pepitas. Los pimientos se liofilizaban antes de la extracción con acetato de etilo.

▪ **Métodos de extracción de capsaicinoides.**

En la abundante bibliografía existente sobre los capsaicinoides se observa que se utilizan una gran variedad de métodos de extracción de capsaicinoides en pimientos, como puede ser la maceración y la extracción en equipo Soxhlet, y en los últimos años han cobrado una gran importancia nuevas técnicas de extracción como la extracción asistida por ultrasonidos, la extracción mediante agitación magnética, la extracción enzimática, la extracción asistida por microondas y la extracción con fluidos supercríticos, en las que en muchas de estas técnicas eran empleadas normalmente para el análisis de contaminantes en suelos, y que en las últimas décadas se han estudiado para el análisis de compuestos naturales en plantas y alimentos.¹⁰⁴

Con respecto a algunas de estas nuevas técnicas de extracción de compuestos naturales desarrolladas en los últimos años, como puede ser la extracción asistida por ultrasonidos (EAU) la extracción asistida por microondas (EAM) o la extracción mediante fluidos presurizados (EFP), no existen metodologías analíticas concretas, ni protocolos de extracción desarrollados para estos compuestos. Únicamente se ha estudiado con profundidad para los capsaicinoides la extracción mediante fluidos supercríticos (EFSC).¹⁰⁵

Por tal motivo, sería interesante el estudio de estas técnicas de extracción, aplicadas a los capsaicinoides procedentes de pimientos o de otros tipos de matrices como pueden ser alimentos procesados a partir de pimientos, como salsas picantes, tabasco, pimentón picante, etc.

A continuación se expone una tabla en la que se describen las características de algunas de las técnicas de extracción que se utilizan con muestras sólidas.

¹⁰⁴ C. W. Huie. "A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 373: 23-30, 2002.

¹⁰⁵ C. Duarte, M. Moldao-Martins, A.F. Gouveia, S. Beirao da Costa, A.E. Leitao, M.G. Bernardo Gil. "Supercritical fluid extraction of red pepper (*Capsicum frutescens* L.)". *The Journal of Supercritical Fluids*, 30: 155-161, 2004.

Técnica de extracción	Descripción
Maceración	La muestra se coloca en el recipiente de extracción y se la mantiene en contacto con el disolvente extractante el tiempo necesario a una temperatura determinada. Se hace necesaria una filtración de la muestra.
Soxhlet convencional	La muestra se coloca en un recipiente de extracción y se lixivia con el disolvente caliente en un extractor Soxhlet durante un tiempo determinado. La evaporación del disolvente se hace por separado.
Soxhlet automatizada	La muestra se coloca en un recipiente de extracción y es introducida en el disolvente hirviendo durante 30-60 minutos. El recipiente es entonces sometido a la extracción Soxhlet con reflujo del disolvente. Es posible hacer una evaporación del disolvente.
Enzimática	La muestra es tratada con enzimas para degradar los tejidos y paredes celulares para facilitar de esta forma el proceso de extracción.
Asistida por Ultrasonidos	La muestra a extraer se coloca en un recipiente de extracción y se le aplican ultrasonidos, pudiendo controlar la temperatura. Se hace necesario la filtración y en ocasiones la centrifugación del material.
Fluidos Supercríticos	La muestra se coloca en una cámara a alta presión y es extraída con el fluido supercrítico que puede circular a través de la muestra en circuito cerrado o abierto (p.ej. CO ₂ a presiones mayores de 72 atm. y a temperaturas mayores de 33 °C). Después de la despresurización, los analitos son recogidos en un pequeño volumen de disolvente orgánico o en una trampa sólida.
Asistida por Microondas	La muestra se coloca en un recipiente abierto o cerrado y se le adiciona el disolvente de extracción. Seguidamente se le suministra energía en forma de microondas.
Fluidos Presurizados	La muestra se coloca en el recipiente de extracción y se presuriza con el disolvente, habitualmente calentado por encima de su punto de ebullición. El extracto es liberado y transferido a un vial

Tabla 5: *Distintos métodos de extracción empleados en el análisis de capsaicinoides.*

Cada una de estas técnicas de extracción presenta una serie de ventajas y de inconvenientes, que las harán más o menos útiles dependiendo del tipo de analito o matriz que se pretenda estudiar o la rapidez y fiabilidad del análisis que se requiera en cada momento.

A modo de resumen, entre las técnicas más comúnmente empleadas, se expone una tabla comparativa en la que se recogen las principales ventajas e inconvenientes que presentan estas técnicas (extracción Soxhlet, extracción asistida por ultrasonidos, extracción mediante fluidos presurizados, extracción asistida por microondas y extracción mediante fluidos presurizados).

CARACTERÍSTICA	Soxhlet	EAU	EFSC	EAM	EFP
Rapidez	--	+	+	+	+
Cantidad de muestra	++	+	+	+	+
Consumo de disolventes	++	+	--	-	-
Variedad de disolventes	+	+	-	+	+
Necesidad de filtración	-	+	-	+	-
Necesidad de concentración	+	-	-	-	-
Exposición a disolventes	++	+	-	+	-
Habilidad del operador	-	-	+	+/-	+
Coste del equipamiento	-	-	+	+	+
Nivel de automatización	-	-	++	++	++

Tabla 6: Comparación de las extracciones Soxhlet, EAU, EFSC, EAM y EFP.

A continuación se pasará a comentar por separado las técnicas de extracción que se emplean para la determinación de capsaicinoides, así como aquellas técnicas de extracción que aun no habían sido empleadas para tal aplicación, pero que han sido desarrolladas en esta tesis.

I. 5. 1. 1. Extracción empleando maceración-agitación de la muestra.

Esta técnica de extracción es una de las más simples que se pueden emplear. Consiste en mantener en contacto la muestra a analizar con el disolvente que se vaya a emplear para realizar la extracción. Es conveniente mantener una agitación constante del medio extractante, tratando de influenciar el gradiente de concentración. Una vez elegido el disolvente que se vaya a emplear para la extracción, las únicas variables que se pueden modificar para mejorar el rendimiento de extracción son la temperatura, el tiempo de extracción y la magnitud en la agitación a la que se someta a la muestra.

Esta técnica requiere una filtración de la muestra posterior a la maceración, para separar las partes sólidas del extracto obtenido, e incluso a veces se hace necesaria una centrifugación del mismo.

Hay diversos autores que han utilizado esta técnica para la determinación de capsaicinoides en muestras de pimientos⁹³. Kirschbaum-Titze y colaboradores extraían mediante maceración cantidades de 10 gramos de muestras frescas de pimientos, con un volumen de 30 mL de metanol. Previa a la maceración, se homogeneizaba la muestra con el disolvente durante un minuto. La extracción se realizaba a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Contreras-Padilla y colaboradores⁷¹ realizaban la extracción mediante agitación magnética constante y sin reflujo de disolvente de muestras secas de pimientos durante 4 horas a una temperatura de 80 °C, empleando como disolvente el acetonitrilo.

I. 5. 1. 2. Empleo de enzimas durante la extracción.

La extracción enzimática es una técnica de extracción que consiste en el empleo de enzimas para destruir o degradar los tejidos y paredes celulares de las muestras biológicas, para que posteriormente en el proceso de extracción, los compuestos de interés presentes en las células, estén más disponibles para poder ser extraídos por los disolventes.

Esta técnica se ha utilizado para la extracción de numerosas semillas y vegetales, aumentando el porcentaje de extracción de los compuestos de interés, como puede ser el aguacate¹⁰⁶, coco¹⁰⁷, soja¹⁰⁸ y semillas de girasol¹⁰⁹ entre otros.

En la bibliografía se recogen diversos trabajos de extracción de capsaicinoides mediante procesos enzimáticos. Santamaría y colaboradores¹¹⁰ han desarrollado un método enzimático de extracción de capsaicinoides a partir del pimiento Chili Guajillo Puya (*Capsicum annum* L.) seco y triturado usando etanol como disolvente. Compararon la eficacia del etanol para la extracción de capsaicinoides con muestras tratadas y sin tratar con enzimas. Observaron que en las extracciones en las que no se había tratado enzimáticamente a las muestras se conseguía extraer un 80 % de los capsaicinoides totales presentes en el pimiento. Si se trataba a las muestras de pimientos, previamente a la extracción con enzimas para romper las paredes celulares, la cantidad de capsaicinoides extraídos posteriormente con el metanol se incrementaba un 7 %.

I. 5. 1. 3. Extracción Soxhlet.

Ésta es una técnica de extracción en semicontinuo pues una de las fases, el sustrato, se agrega solo al principio mientras que el disolvente de extracción cumple un ciclo de extracción y purificación continua. La purificación se realiza en forma paralela por destilación del disolvente, de manera que el sustrato siempre está en contacto con el

¹⁰⁶ M. Buenrostro, C.A. López-Munguía. "Enzymatic extraction of avocado oil". *Biotechnology Letters*, 5: 505-506, 1986.

¹⁰⁷ O.C. MacGlone, C.A. López-Munguía, J.V. Carter. "Coconut oil extraction by a new enzymatic process". *Journal of Food Science*, 51: 695-697, 1986.

¹⁰⁸ D. Shankar, Y.C. Agrawal, B.C. Sarkar, B.P.N. Singh. "Enzymatic hydrolysis in conjunction with conventional pretreatments to soybean for enhanced oil availability and recovery". *Journal of the American Oil Chemical Society*, 74: 1543-1547, 1997.

¹⁰⁹ H. Domínguez, M.J. Núñez, J.M. Lema. "Oil extractability from enzymatically treated soybean and sunflower: range of operational variables". *Food Chemistry*, 46: 277-284, 1993.

¹¹⁰ R.I. Santamaría, M.D. Reyes-Duarte, E. Bárzana, D. Fernando, F.M. Gama, M. Mota, A. López-Munguía. "Selective enzyme-mediated extraction of Capsaicinoids and Carotenoids from Chili Guajillo Puya (*Capsicum annum* L.) using ethanol as solvent". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3063-3067, 2000.

disolvente puro. Es útil en escala de laboratorio a pesar de que la extracción no tenga una alta eficiencia, pues la regeneración del disolvente se realiza automáticamente evitando excesivas manipulaciones.

La extracción Soxhlet asegura un íntimo contacto de la matriz de la muestra con el disolvente de extracción. El extractor Soxhlet ha sido modificado en distintos aspectos, en algunos casos tratando de aumentar la temperatura del disolvente que entra en contacto con la mezcla a extraer, con el fin de reducir la mezcla de extracción. La rápida solubilización realizada por el disolvente caliente permite reducir notablemente los tiempos de extracción.

Entre las ventajas que posee dicha técnica se resalta que permite el uso de grandes cantidades de muestra (p.ej. de 10 a 30 g.) y no requiere filtración después de la extracción. La técnica no es dependiente de la matriz y muchos extractores Soxhlet pueden utilizarse sin controlarlos continuamente. De hecho, existen algunos sistemas comerciales automáticos que incluso permiten realizar varias extracciones a la vez.

Entre sus inconvenientes, destacamos sus largos tiempos de extracción (p. ej. tiempos superiores a 24-48 horas), el uso de grandes volúmenes de disolventes, y la necesidad de evaporación del disolvente tras la extracción.

Diversos autores han utilizado la técnica de extracción Soxhlet para la extracción de capsaicinoides^{103,97}. Korel y colaboradores utilizaron esta técnica para la extracción de capsaicinoides. Los extractos eran obtenidos, a partir de 10 gramos de pimientos rojos secados previamente, por recirculación de 250 mL de acetona en un extractor tipo Soxhlet durante 5 horas.

Krajewska y Powers¹¹¹ también utilizaron esta técnica para la extracción de capsaicinoides en pimientos picantes de muy diversas clases y procedencias. Para ello realizaban la extracción de las muestras de pimientos bien secos o liofilizados, durante 3 horas con 150 mL de acetona.

I. 5. 1. 4. Extracción asistida por ultrasonidos (EAU).

El sonido surge como resultado del recorrido de la energía mecánica a través de la materia, en forma de una onda que produce alternadamente los fenómenos de compresión y rarefacción. Las ondas de presión se propagan por el desplazamiento físico del material a través del cual el sonido está siendo transmitido. Como resultado de estos cambios en la presión, surge una onda sinusoidal (figura 11). Los cambios de la presión en función del tiempo constituyen las unidades básicas de medida del sonido. A la distancia entre puntos correspondientes de la curva tiempo-presión, se le conoce como longitud de onda, λ . Se llama periodo al tiempo T necesario para completar un ciclo. El número de ciclos completos por unidad de tiempo, es la frecuencia del sonido. La frecuencia y el periodo son inversamente proporcionales.¹¹²

¹¹¹ A.M. Krajewska, J.J. Powers. "Gas chromatography of methyl derivatives of naturally occurring capsaicinoids". Journal of Chromatography A, 409: 223-233, 1987.

¹¹² J.P. Walter. "Physics of high-resolution ultrasound - Practical aspects". Radiologic Clinics North America, 23: 3-11, 1985.

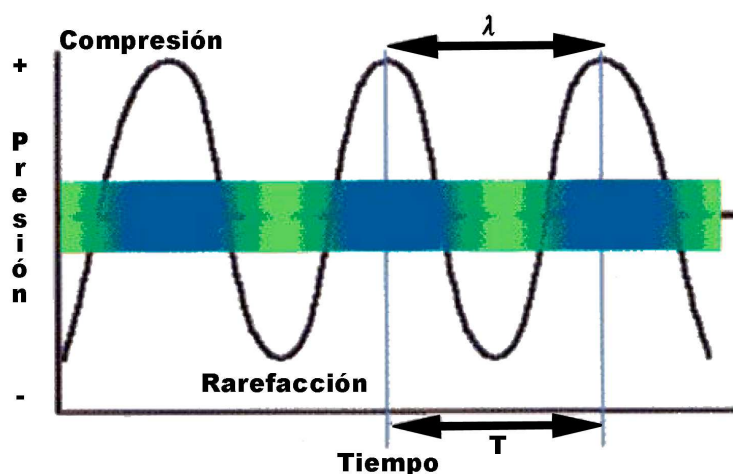


Figura 11: Ondas Sonoras. El sonido se transmite en forma de ondas de presión alternantes que provocan los fenómenos de compresión y rarefacción en el medio conductor

Las frecuencias altas se expresan en Kilohercio (kHz; 1 kHz = 1.000 Hz) o megahercio. El rango de frecuencias acústicas se encuentra entre menos de 1 Hz y más de 100.000 Hz (100 kHz). En el ser humano, la capacidad de audición se limita al área más baja de ese rango, oscilando entre 20Hz y 20.000 Hz. Los ultrasonidos se diferencian del sonido audible únicamente en la frecuencia, que es 500 a 1.000 veces mayor que la del sonido que normalmente oímos. (figura 12).

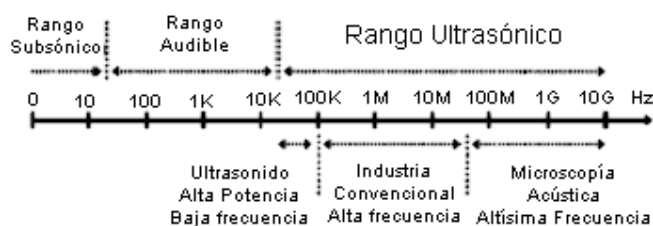


Figura 12: Rango de frecuencias del ultrasonido.

Su principal diferencia con las ondas electromagnéticas es que el ultrasonido requiere de un medio elástico para ser transmitido (sólido, líquido o gaseoso). La velocidad de propagación viene determinada, en gran medida, por la resistencia del medio a la compresión, que depende a su vez de la densidad, rigidez y elasticidad del medio. Así, la velocidad de propagación aumenta al hacerlo la rigidez y disminuye cuando aumenta la densidad.

La EAU se basa en el empleo de la energía derivada de los ultrasonidos para facilitar la extracción, a partir de la muestra, de los analitos por el disolvente orgánico seleccionado en función de la naturaleza de los solutos a extraer.

La aplicación de los ultrasonidos en un medio líquido provoca el fenómeno de la cavitación. Este proceso se divide en dos etapas:

1- Durante la primera fase, la **depresión**, se crea en el interior del líquido una infinidad de burbujas (cavidades).

2- Durante la segunda fase, la **compresión**, la enorme presión ejercida sobre estos puntos hacen que estos se compriman hasta hacerlos colapsar en sí mismos (implosión) o simplemente acumular energía para volver a pasar a la primera fase, con el consiguiente desprendimiento de energía que a su vez imprime una velocidad o flujo dentro del fluido produciendo un movimiento de masa. La extracción se ve facilitada y acelerada gracias a esa energía.

Los efectos mecánicos y químicos de la cavitación son importantes y tienen un amplio rango de aplicaciones. En la **Tabla 7** se resumen algunas de estas aplicaciones.

EFEECTO DE LA CAVITACIÓN	APLICACION
Efecto en las células vivas	Estimulación de la actividad Destrucción sonoquímica
Efecto en las enzimas	Estimulación de la actividad Desnaturalización controlada
Efecto de impacto del “jet” en la superficie	Impregnación mejorada Extracción mejorada
Aplicaciones diversas	Procesado de carnes Cristalización y congelamiento Emulsificación Filtración y secado Tratamiento de arroz

Tabla 7: *Aplicaciones de los ultrasonidos en la tecnología de alimentos*

Un ejemplo de las aplicaciones de los ultrasonidos es en la digestión enzimática de especies metálicas. En una revisión realizada por Bermejo y colaboradores¹¹³ sobre el tema, se destaca el potencial de la aplicación de los ultrasonidos tanto por medio de una sonda ultrasónica como de baño de ultrasonidos para acelerar la digestión y extracción de estas especies.

¹¹³ P. Bermejo, J.L. Capelo, A. Mota, Y. Madrid, C. Camara. “Enzymatic digestion and ultrasonication: a powerful combination in analytical chemistry”. Trends in Analytical Chemistry, 23: 654-663, 2004.

La extracción asistida por ultrasonidos es usada como un método simple y barato de extracción con disolventes líquidos aplicado a analitos en matrices sólidas como pueden ser las muestras de pimientos. La ventaja de la optimización de un procedimiento de extracción mediante el empleo de ultrasonidos es que se consiguen mejores eficiencias de extracción, con un mínimo consumo de disolventes y en tiempos inferiores a las técnicas de extracción convencionales, como puede ser la maceración. Esto es debido a que el área de la superficie de contacto entre la fase sólida y la líquida es mucho mayor¹¹⁴. Todo ello conlleva a un ahorro de tiempo y de disolvente, lo que se traduce en un menor consumo de dinero y en la conservación del medio ambiente.

Las técnicas clásicas de extracción con disolventes de materiales de matrices vegetales se basan en la correcta selección del disolvente acoplado al uso de temperatura y/o de agitación. La extracción de los compuestos orgánicos que contiene la semilla o parte de la planta se ve significativamente mejorada con el uso de ultrasonidos. El efecto mecánico de los ultrasonidos proporciona una mayor penetración del disolvente en el material intracelular y mejora la transferencia de masas y tiene la ventaja añadida que resulta de la ruptura de las paredes de las células facilitando la liberación de los contenidos y consecuentemente mejorando la extracción.

Por otro lado, el fenómeno de implosión se define como el instante en el cual la velocidad de la pared de la burbuja alcanza la velocidad del sonido en el líquido y forma así una discontinuidad o “shock”.

En el momento en que una cavidad completa su ciclo de vida, esta implota y libera energía. Gran parte de esta energía se convierte en un “jet” o chorro que actúa sobre cada una de las partículas de los líquidos inmiscibles que se encuentran alrededor o en una vecindad de la cavidad. Esto produce un flujo local que realiza un movimiento de partículas dentro del volumen y consecuentemente este flujo crea una microagitación que es superior a la producida por la tradicional agitación magnética. Los efectos combinados de la microagitación con la transferencia de masas mejorada dan como resultado un método de extracción más eficiente para la extracción de compuestos naturales.

Los resultados obtenidos con la EAU son similares a los de una extracción Soxhlet pero la duración no suele ser superior a los 30 minutos en la mayoría de los casos. En algunos casos, se han obtenido recuperaciones similares a las logradas con la extracción asistida por microondas.¹¹⁵

La aplicación de esta técnica a las plantas ha producido resultados muy interesantes¹¹⁶, de hecho se ha propuesto extenderla al procesado industrial para obtener compuestos con propiedades farmacológicas.¹¹⁷

Esta técnica se ha empleado con gran éxito para extraer distintos compuestos orgánicos de distintas matrices como hidrocarburos aromáticos policíclicos en

¹¹⁴ A.V.Filgueiras, J.L. Capelo, I. Lavilla, C. Bendicho. “Comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion for determination of magnesium, manganese and zinc in plant samples by flame atomic absorption spectrometry”. *Talanta*, 53: 433-441, 2000.

¹¹⁵ A. Pastor, E. Vázquez, R. Ciscar, M. De la Guardia. “Efficiency of the microwave-assisted extraction of hydrocarbons and pesticides from sediments”. *Analytica Chimica Acta*, 344: 241-249, 1997.

¹¹⁶ Z. Hromádková, A. Ebringerová, P. Valachovic. “Comparison of classical and ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Salvia officinalis* L.”. *Ultrasonics Sonochemistry*, 5: 163-168, 1999.

¹¹⁷ P. Valachovic, A. Pechova, T.J. Mason. “Towards the industrial production of medicinal tincture by ultrasound assisted extraction”. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8: 111-117, 2001.

sedimentos¹¹⁸, compuestos fenólicos en cremas¹¹⁹, pesticidas clorados en hígados de pájaros¹²⁰, nicotina en medicamentos¹²¹, ácidos orgánicos en uvas¹²², compuestos fenólicos en fresas¹²³, isoflavonas en soja¹²⁴, etc.

Los ultrasonidos también han sido empleados como una herramienta para la extracción de capsaicinoides en pimientos. Varios autores han aplicado esta técnica de extracción a la hora de analizar los capsaicinoides presentes en los pimientos. Karnka y colaboradores⁹² optimizaron la extracción de capsaicinoides en muestras de pimientos picantes mediante ultrasonidos. Optimizaron el tiempo de extracción, así como el volumen de disolvente a utilizar. Para ello utilizaron cantidades de muestras de 0,3 gramos y las sometieron a ultrasonidos con volúmenes de 10, 15, 20, 30 y 40 ml de acetonitrilo durante 60 minutos. También con la misma cantidad de muestra, se realizaron extracciones con 10 ml de acetonitrilo durante 10, 30, 45, 60, 75 y 105 minutos. Como resultado del trabajo, se obtuvo que las mejores condiciones de extracción fueron 60 minutos usando como volumen de disolvente 10 ml. Ningún otro parámetro fue estudiado.

Daood y colaboradores¹²⁵ realizaron la determinación de capsaicinoides en pimiento páprika picante (*Capsicum annuum* L.) mediante extracción con ultrasonidos en comparación con la extracción mediante fluidos supercríticos. Para ello tomaban 1 gramo de pimiento y lo extraían con 10 mL de metanol en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos.

A pesar de que esta técnica ha sido empleada para la extracción de capsaicinoides en pimientos, no hay un protocolo definido, ni estudios exhaustivos acerca del efecto de los ultrasonidos en la extracción de esta familia de compuestos. Por todo ello se hace necesario evaluar los distintos parámetros que pueden influir en la extracción de los capsaicinoides mediante el empleo de esta técnica, como pueden ser el disolvente, el tiempo de extracción, la temperatura, la cantidad de muestra o el volumen de disolvente a emplear.

¹¹⁸ D.R. Banjoo, P.K. Nelson. "Improved ultrasonic extraction procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments". Journal of Chromatography A, 1066: 9-18, 2005.

¹¹⁹ M. Padilla, M. Palma and C.G. Barroso. "Determination of phenolics in cosmetic creams and similar emulsions". Journal of Chromatography A, 1091: 83-88, 2005.

¹²⁰ D.A. Lambropoulou, I.K. Konstantinou, T.A. Albanis. "Coupling of headspace solid phase microextraction with ultrasonic extraction for the determination of chlorinated pesticides in bird livers using gas chromatography". Analytica Chimica Acta, 573-574: 223-230, 2006.

¹²¹ Y. Zuo, L. Zhang, J. Wu, J.W. Fritz, S. Medeiros, C. Rego. "Ultrasonic extraction and capillary gas chromatography determination of nicotine in pharmaceutical formulations". Analytica Chimica Acta, 526: 35-39, 2004.

¹²² M. Palma, C.G. Barroso. "Ultrasound-assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products". Analytica Chimica Acta, 458: 119-130, 2002.

¹²³ M.C. Herrera, M.D. Luque de Castro. "Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection". Journal of Chromatography A, 1100: 1-7, 2005.

¹²⁴ M.A. Rostagno, M.Palma, C.G. Barroso. "Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones". Journal of Chromatography A, 1012: 119-128, 2003.

¹²⁵ H.G. Daood, V. Illés, M.H. Gnaifed, B. Mészáros, G. Horváth, P.A. Biacs. "Extraction of pungent spice paprika by supercritical carbon dioxide and subcritical propane". The Journal of Supercritical Fluids, 23: 143-152, 2002.

I. 5. 1. 5. Extracción mediante fluidos presurizados.

La técnica de extracción mediante fluidos presurizados se basa en la extracción de la muestra empleando el fluido por encima de su punto de ebullición y utilizando presiones lo suficientemente altas para mantenerlo en estado líquido, sin alcanzar el estado crítico. Esta extracción permite obtener extracciones cuantitativas, en algunos casos, en menos de 15 minutos.¹²⁶

La elevada temperatura a la que se somete a la muestra durante la extracción, cuando la comparamos con la extracción convencional Soxhlet, incrementa la capacidad del disolvente para solubilizar el analito y la elevada presión que se utiliza incrementa la velocidad de difusión en los poros de la matriz, facilitándose la transferencia de masa del analito en el disolvente extractante. Sabemos que al incrementar la temperatura se facilita la ruptura de los enlaces entre el analito y la matriz, y que se disminuye la viscosidad del disolvente (una menor viscosidad significa una mejor penetración en la matriz y por tanto se incrementa el rendimiento de extracción).

Esta técnica es muy atractiva por muchas razones. Es una técnica rápida (p. ej. el tiempo de extracción es aproximadamente de 15 minutos por muestra en muchos de los casos), usa volúmenes mínimos de disolvente, no requiere filtración tras la extracción y la instrumentación permite operar automáticamente. Entre sus inconvenientes destacan la necesidad de comprobar la estabilidad de los analitos a alta temperatura y el coste elevado del equipamiento.

Respecto a las consideraciones fisicoquímicas de las extracciones a elevadas presiones y temperaturas, hay dos razones por las que el uso de disolventes líquidos a elevadas temperaturas y presiones proporcionará un mejor rendimiento que las extracciones a temperaturas próximas a la ambiental y a presión atmosférica: los efectos de solubilidad y transferencia de masas y la interrupción del equilibrio de superficie.

Efectos de solubilidad y transferencia de masas:

El uso de altas temperaturas incrementa la capacidad del disolvente de solubilizar analitos. Por ejemplo, basándonos en cálculos de la dependencia de la solubilidad con la temperatura de una disolución ideal, la solubilidad del antraceno en agua se incrementa en casi trece veces cuando se incrementa la temperatura de 50 a 150 °C. Sekine y Hasegawa¹²⁷ destacan que la solubilidad del agua en disolventes orgánicos se incrementará al incrementar la temperatura. Esto es especialmente interesante en los casos en que los disolventes a bajas temperaturas y presiones queden excluidos de los poros ocluidos con agua que contengan analitos. El aumento de la solubilidad del agua en disolventes orgánicos causado por elevadas temperaturas facilitará la disponibilidad de esos poros ocluidos y de los analitos contenidos en su interior.

Como resultado del incremento de la temperatura de extracción se consiguen velocidades de difusión más rápidas.

¹²⁶ B.E. Richter, B.A. Jones, J.L. Ezzell, N.L. Porter, N. Avdalovic, C. Pohl. "Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation". *Analytical Chemistry*, 68: 1033-1039, 1996.

¹²⁷ T. Sekine, Y. Hasegawa. "Solvent Extraction Chemistry". Marcel Dekker, New York, 1977.

Si se renueva el disolvente empleado durante la etapa de extracción estática (como ocurre con la extracción Soxhlet y en la EFSC), se consigue mejorar la transferencia de masa y, por tanto, incrementar las velocidades de extracción. La renovación del disolvente incrementará el gradiente de concentración entre la solución presente en la cámara o célula de extracción y la superficie de la matriz de la muestra. Según la primera ley de difusión de Fick, cuanto mayor sea el gradiente de concentración, más rápida será la velocidad de transferencia de masa. El mismo efecto se consigue en la EFP realizando la misma en varios ciclos, cada uno de ellos con disolvente nuevo.

Interrupción del equilibrio de superficie:

El uso de altas temperaturas puede interrumpir las fuertes interacciones soluto-matriz causadas por fuerzas de Van der Waals, enlaces por puente de hidrógeno y atracciones dipolares de las moléculas del soluto y los sitios activos de la matriz. La energía térmica puede superar las interacciones cohesivas (soluto-soluto) y adhesivas (soluto-matriz) disminuyendo la energía de activación requerida para el proceso de desorción.

Las elevadas temperaturas también disminuyen la viscosidad de los disolventes líquidos, permitiendo una mejor penetración en las partículas de la matriz y favoreciendo la extracción.

También se disminuye la tensión superficial del disolvente, de los solutos y de la matriz, permitiendo que el disolvente “humedezca” la matriz de la muestra. Ambos cambios facilitan el mejor contacto de los analitos con el disolvente y favorecen la extracción. Una disminución en la tensión superficial del disolvente también permitirá que los analitos se disuelvan más rápidamente en el disolvente.

Si se ejerce suficiente presión en el disolvente durante las extracciones, se pueden utilizar temperaturas por encima del punto de ebullición. El uso de elevadas temperaturas y sus ventajas asociadas sería imposible sin el uso de elevadas presiones para mantener los disolventes en estado líquido.

El uso de la presión facilitará las extracciones a partir de muestras en las que los analitos se encuentren atrapados en los poros de la matriz. El uso de elevadas presiones (junto con elevadas temperaturas y la reducción de las tensiones superficiales) forzará al disolvente a que entre en contacto con los analitos en los poros.

Aplicaciones de la EFP.

Esta técnica se diseñó primeramente para análisis medioambientales tal como se expone en diversas revisiones.^{128,129}

Sin embargo, el número de aplicaciones para alimentos y muestras biológicas ha aumentado mucho en los últimos años, así como su importancia. Carabias-Martínez¹³⁰ y

¹²⁸ L. Ramos, E.M. Kristenson, U.T. Th. Brinkman. “Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis”. *Journal of Chromatography A*, 975: 3-29, 2002.

¹²⁹ V. Andreu, Y. Picó. “Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods”. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23: 772-789, 2004.

¹³⁰ R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, P. Revilla-Ruiz, J. Hernández-Méndez. “Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples”. *Journal of Chromatography A*, 1089: 1-17, 2005.

colaboradores hacen una revisión de estas aplicaciones, con énfasis en las estrategias usadas para la obtención de procesos de extracción rápidos, selectivos, eficientes y fiables.

De esta forma, en los últimos años, el empleo de esta técnica ha avanzado enormemente en el análisis y extracción de alimentos y de productos naturales provenientes de plantas. Esta técnica se ha empleado para la extracción de compuestos farmacológicamente activos como ginsenoides¹³¹ y berberina¹³² en plantas medicinales entre otros.

También esta técnica ha sido enormemente empleada para la extracción y análisis de compuestos fenólicos y polifenólicos como polifenoles en manzanas¹³³ o proantocianidinas en malta¹³⁴, además de muchos otros productos naturales como isoflavonas de soja¹³⁵, caroteno y tocoferol de los residuos de la obtención del aceite de palma¹³⁶, etc.

En cuanto a extracción de analitos similares, dentro del grupo de investigación donde se desarrolla el presente trabajo, y concretamente para el caso de compuestos fenólicos, en uno de los primeros estudios sobre extracción mediante la EFP, Palma y colaboradores¹³⁷ determinaron la estabilidad durante la EFP de este tipo de compuestos. Se concluyó en dicho estudio que durante la EFP, los compuestos fenólicos ensayados no se degradaban, con excepción de la catequina y la epicatequina.

Posteriormente Rostagno y colaboradores¹³⁸ desarrollaron un método de extracción de isoflavonas de soja mediante el empleo de esta técnica. Se optimizaron determinados parámetros de extracción por este método, tal como la temperatura de extracción, la presión, el disolvente a emplear, el número de ciclos de extracción, el tiempo de duración de cada ciclo y la cantidad de muestra utilizada en la extracción, entre otros.

Finalmente, Palma y colaboradores¹³⁹ también desarrollaron un método de extracción de compuestos fenólicos en uvas empleando la EFP acoplada a la extracción en fase sólida. Estos mismos autores han desarrollado un método de extracción específico para la catequina empleando la EFP.¹⁴⁰

¹³¹ M.P.K. Choi, K.K.C. Chan, H.W. Leung, C. W. Huie. "Pressurized liquid extraction of active ingredients (ginsenosides) from medicinal plants using non-ionic surfactant solutions". *Journal of Chromatography A*, 983: 153-162, 2003.

¹³² E.S. Ong, S.O. Woo, Y.L. Yong. "Pressurized liquid extraction of berberine and aristolochic acids in medicinal plants". *Journal of Chromatography A*, 904: 57-64, 2005.

¹³³ R.M. Alonso-Salces, A. Barranco, E. Corta, L.A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente. "A validated solid-liquid extraction method for the HPLC determination of polyphenols in apple tissues: Comparison with pressurised liquid extraction". *Talanta*, 65: 654-662, 2005.

¹³⁴ M. Papagiannopoulos, B. Zimmermann, A. Mellenthin, M. Krappe, G. Maio, R. Galensa. "Online coupling of pressurized liquid extraction, solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography for automated analysis of proanthocyanidins in malt". *Journal of Chromatography A*, 958: 9-16, 2002.

¹³⁵ B. Klejdus, R. Mikelová, J. Petrlová, D. Potěšil, V. Adam, M. Stiborová, P. Hodek, J. Vacek, R. Kizek, V. Kubáň. "Determination of isoflavones in soy bits by fast column high-performance liquid chromatography coupled with UV-visible diode-array detection". *Journal of Chromatography A*, 1084: 71-79, 2005.

¹³⁶ M.M. Sanagi, H.H. See, W.A.W. Ibrahim, A.A. Naim. "Determination of carotene, tocopherols and tocotrienols in residue oil from palm pressed fiber using pressurized liquid extraction-normal phase liquid chromatography". *Analytica Chimica Acta*, 538: 71-76, 2005.

¹³⁷ M. Palma, Z. Piñeiro, C.G. Barroso. "Stability of phenolic compounds during extraction with superheated solvents". *Journal of Chromatography A*, 921: 169-174, 2001.

¹³⁸ M. A. Rostagno, M. Palma, C. G. Barroso. "Pressurized liquid extraction of isoflavones from soybeans". *Analytica Chimica Acta*, 522: 169-177, 2004.

¹³⁹ M. Palma, Z. Piñeiro, C.G. Barroso. "In-line pressurized-fluid extraction-solid-phase extraction for determining phenolic compounds in grapes". *Journal of Chromatography A*, 968: 1-6, 2002.

¹⁴⁰ Z. Piñeiro, M. Palma, C.G. Barroso. "Determination of catechins by means of extraction with pressurized liquids". *Journal of Chromatography A*, 1026: 19-23, 2004.

Así pues, se puede decir que esta técnica de uso reciente en alimentos, está comenzando a ser ampliamente considerada a la hora de preparar muestras sólidas para su análisis, ya que proporciona extractos relativamente limpios, es rápida, consume pequeños volúmenes de disolventes y puede utilizarse de forma automática, lo que conlleva la eliminación de muchos errores de operación y la eliminación de tiempo de trabajo.

Hasta el momento no se han realizado investigaciones sobre el potencial de la EFP para la extracción de capsaicinoides o capsinoides en pimientos, de modo que también sería interesante llevar a cabo la optimización de diversos parámetros de extracción como el disolvente apropiado, la temperatura de extracción, el tiempo, el volumen de disolvente, etc.

I. 5. 1. 6. Extracción asistida por microondas.

Las microondas son ondas de alta frecuencia electromagnética situadas entre las regiones de radio-frecuencia e infrarroja en el espectro electromagnético (con un rango de frecuencias entre 0,3-300 GHz).

A diferencia del calentamiento convencional donde el calor penetra lentamente desde el exterior al interior de un objeto, la energía de microonda es “fría” produciendo calor. El calentamiento aparece justo en el núcleo del objeto que está siendo calentado, y el calor se extiende desde el interior al exterior del cuerpo.

La energía de microondas afecta a las moléculas por conducción iónica y rotación dipolar. En muchas aplicaciones estos dos mecanismos ocurren simultáneamente. En la conducción iónica los iones en disolución migrarán cuando se aplique el campo electromagnético. La resistencia de la disolución a este flujo de iones producirá la fricción y, por tanto, el calentamiento de la disolución. La rotación dipolar supone un realineamiento de los dipolos con el campo aplicado. Estos movimientos moleculares forzados producen una “fricción” molecular y un calentamiento.

Cuanto mayor sea el momento dipolar del disolvente más rápido se calentará el mismo bajo irradiación de microondas. La habilidad de un disolvente para absorber la energía de microondas y pasarla en forma de calor a otras moléculas depende en parte del factor de disipación ($\tan \delta$). El factor de disipación es dado por la siguiente ecuación:

$$\tan \delta = \varepsilon'' / \varepsilon'$$

Donde ε'' es la pérdida dieléctrica (una medida de la eficacia de transformación de energía de microondas a calor) y ε' es la constante dieléctrica (una medida de la polarizabilidad de una molécula en un campo magnético). Moléculas polares y soluciones iónicas (normalmente ácidos) absorben fuertemente las microondas por que tienen un momento dipolar permanente, el cual interactúa con las microondas. Sin embargo, disolventes apolares como el hexano no se calientan cuando se exponen a las microondas. En la tabla 8 se presentan algunos parámetros, incluidos las constantes dieléctricas y

factores de disipación de los disolventes usados en más del 90 % de las aplicaciones con microondas.

Disolvente	Constante Dielectrica (ϵ') ^a	Momento Dipolar ^b	Factor de Disipación Tan δ ($\times 10^{-4}$)	Punto de Ebullición (°C) ^c	Temperatura en recipiente cerrado (°C) ^d
Acetona	20.7			56	164
Acetonitrilo	37.5			82	194
Etanol	24.3	1.96	2500	78	164
Hexano	1.89			69	- ^e
Metanol	32.6	2.87	6400	65	151
2-Propanol	19.9	1.66	6700	82	145
Agua	79.3	2.3	1570	100	
Hexano-acetona (1:1)				52	156

Tabla 8: Constantes físicas y factores de disipación de algunos disolventes empleados habitualmente en EAM. a (determinado a 20 °C); b (determinado a 25 °C); c (determinado a 101.4 kPa); d (determinado a 1027 kPa); e (no se calienta).

Una simple comparación entre el metanol y el agua muestra que el metanol tiene una constante dieléctrica inferior, pero también tiene una pérdida dieléctrica más baja que el agua. Esto indica que el metanol, comparado con el agua, tiene una menor capacidad de obstrucción a las microondas cuando ellas pasan a través de él, pero también posee una mayor habilidad de disipar la energía de microondas en energía. En recipientes cerrados, el disolvente puede ser calentado por encima de su punto de ebullición, y de esta forma se aumenta la eficacia de extracción y la velocidad del proceso. Algunas temperaturas usualmente usadas en la EAM también se presentan en la tabla 8.

El hecho de que diferentes sustancias químicas absorban la energía de las microondas de distinta forma, implica que el calentamiento impartido al medio cercano varía con las sustancias químicas empleadas. Por lo tanto, para muestras con características estructurales heterogéneas, con diferentes propiedades dieléctricas, dispersas en un ambiente heterogéneo, es posible producir un calentamiento selectivo de algunas áreas, o componentes de la muestra.

El proceso de calentamiento durante la extracción puede ocurrir por diversos mecanismos. La muestra puede estar sumergida en un solo disolvente o en una mezcla de ellos que absorban fuertemente la energía de microondas; la muestra puede ser extraída con un disolvente combinado, conteniendo tanto alta y baja pérdida dieléctrica, mezclado

en diferentes proporciones; muestras que tienen una alta pérdida dieléctrica pueden ser extraídas con un disolvente transparente para microondas. Usualmente extracciones y fraccionamiento de los solutos pueden ocurrir por cualquiera de estos tres mecanismos de calentamiento o por una combinación de ellos.

La optimización de las condiciones de la EAM ha sido investigada empleando diseños factoriales y compuestos centrales y ortogonales para encontrar las condiciones óptimas de extracción.^{141,142,143}

Los parámetros de extracción más estudiados son el disolvente de extracción, el volumen de disolvente, la temperatura de extracción, el tiempo de extracción y las características de la matriz, incluido el contenido en agua.

La selección del disolvente apropiado es la clave para una extracción óptima. Para seleccionar los disolventes se deben considerar las propiedades de absorción de las microondas por el mismo, la interacción del disolvente con la matriz y la solubilidad del analito en el disolvente.

Sin embargo, la temperatura es el parámetro más estudiado en la EAM, lo cual no es sorprendente ya que la temperatura es un factor muy importante que contribuye para mejorar recuperaciones no solamente en la EAM, sino para todas las técnicas de extracción.

Cuando la extracción es llevada a cabo en recipientes cerrados, la temperatura puede alcanzar valores superiores a los puntos de ebullición de los disolventes. Para la mayoría de los disolventes la temperatura dentro del recipiente es dos o tres veces el punto de ebullición de los mismos. Estas elevadas temperaturas conducen a una mejora en la eficacia de extracción ya que la desorción de los analitos de los sitios activos de la matriz se ve mejorada. Además, los disolventes tienen una mayor capacidad de solubilizar los analitos a temperaturas más elevadas, mientras que la tensión superficial y la viscosidad del disolvente disminuyen con la temperatura, lo cual mejora la penetración en la matriz.

Por otro lado, los tiempos de extracción con la EAM suelen ser muy cortos cuando se comparan con las técnicas convencionales. Muchas veces 10 minutos son suficientes, pero han sido empleadas extracciones de hasta 3 minutos para la extracción de pesticidas en suelos.¹⁴⁴

Un aspecto importante es la estabilidad de los compuestos de interés, que pueden ser susceptibles a degradaciones si se exponen a tiempos prolongados a alta temperatura durante la extracción.

Otros factores importantes a tener en cuenta son: la compatibilidad entre el disolvente de extracción y el método analítico usado en el análisis del extracto (los disolventes menos

¹⁴¹ M.P. Llompарт, R.A. Lorenzo, R. Cela, J.R.J. Pare. "Optimization of a microwave-assisted extraction method for phenol and methylphenol isomers in soil using a central composite design". *Analyst*, 122: 133-137, 1997.

¹⁴² A. Eguizabal, O. Zuloaga, N. Etxebarria, L.A. Fernández, J.M. Madariaga. "Comparison of microwaveassisted extraction and Soxhlet extraction for phenols in soil samples using experimental designs". *Analyst*, 123: 1679-1684, 1998.

¹⁴³ S. Morales, P. Canosa, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela. "Microwave assisted extraction followed by gas chromatography with tandem mass spectrometry for the determination of triclosan and two related chlorophenols in sludge and sediments". *Journal of Chromatography A*, 1082: 128-135, 2005.

¹⁴⁴ F.I. Onuska, K.A. Terry. "Extraction of pesticides from sediments using a microwave technique". *Chromatographia*, 36: 191-194, 1993.

polares parecen preferirse para el análisis por CG, mientras que disolventes más polares son preferibles para análisis por CLAE o técnicas de inmunoensayo). Se ha encontrado poca información sobre la selectividad de la EAM en la bibliografía ya que la técnica es tan eficiente que no puede considerarse una técnica selectiva de extracción. Suele ser necesaria una etapa de limpieza tras la extracción en casi todos los casos.

La EAM ha sido aplicada con éxito para diversos tipos de compuestos y de muestras. En una revisión por Eskilsson y Bjorlund¹⁴⁵ se reúnen diversas aplicaciones así como aspectos interesantes de la aplicación de la EAM a escala analítica.

En un principio, la mayoría de las aplicaciones se centran en el análisis de distintos tipos de contaminantes en diversas matrices como pueden ser bifenilos policlorados en suelos¹⁴⁶, hidrocarburos aromáticos policíclicos en sedimentos¹⁴⁷, pesticidas organoclorados en agua y sedimentos¹⁴⁸, clorofenoles en suelos y sedimentos¹⁴⁹, metilmercurio en materiales de referencia¹⁵⁰, etc.

Esta técnica se utiliza también desde hace algunos años, como una práctica rutinaria para la digestión por microondas, usando ácidos minerales acuosos, de determinadas matrices para análisis elementales.

En los últimos años, se ha observado un incremento enorme en el empleo de esta técnica como método de extracción de compuestos naturales y de interés biológico, provenientes de plantas y de alimentos. Así, se han desarrollado un gran número de métodos de extracción de compuestos con interés biológico como pueden ser compuestos fenólicos en plantas¹⁵¹, piperina en pimienta¹⁵², carotenoides y pigmentos en pimentones¹⁵³, fenoles en semillas de uva¹⁵⁴, pectinas en naranjas¹⁵⁵, etc. Estos trabajos muestran que estos compuestos son extraídos con una gran eficacia cuando se emplea la energía proporcionada por los microondas, generalmente con mejores rendimientos y en tiempos inferiores que si se utilizan técnicas convencionales de extracción.

¹⁴⁵ C.S. Eskilsson, E. Björklund. "Analytical-scale microwave-assisted extraction". *Journal of Chromatography A*, 902: 227-250, 2000.

¹⁴⁶ J.L. Luque-García, M.D. Luque de Castro. "Extraction of polychlorinated biphenyls from soils by automated focused microwave-assisted Soxhlet extraction". *Journal of Chromatography A*, 998: 21-29, 2003.

¹⁴⁷ M. Ericsson, A. Colmsjö. "Dynamic microwave-assisted extraction coupled on-line with solid-phase extraction: determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment and soil". *Journal of Chromatography A*, 964: 11-20, 2002.

¹⁴⁸ O.S. Fatoki, R.O. Awofolu. "Methods for selective determination of persistent organochlorine pesticide residues in water and sediments by capillary gas chromatography and electron-capture detection". *Journal of Chromatography A*, 983: 225-236, 2003.

¹⁴⁹ M.C. Wei, J.F. Jen. "Determination of chlorophenols in soil samples by microwave-assisted extraction coupled to headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron-capture detection". *Journal of Chromatography A*, 1012: 111-118, 2003.

¹⁵⁰ M.J. Vázquez, M. Abuín, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, R. Cela. "Experimental design approach for the extraction of methylmercury from certified reference materials using microwave energy". *Chemosphere*, 39: 1211-1224, 1999.

¹⁵¹ D. Sterbová, D. Matejíček, J. Vlček, V. Kubán. "Combined microwave-assisted isolation and solid-phase purification procedures prior to the chromatographic determination of phenolic compounds in plant materials". *Analytica Chimica Acta*, 513: 435-444, 2004.

¹⁵² G. Raman, V.G. Gaikar. "Microwave-assisted extraction of piperine from *Piper nigrum*". *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 41 (10): 2521-2528, 2002.

¹⁵³ G.A.C. Kiss, E. Forgács, T. Cserhádi, T. Mota, H. Morais, A. Ramos. "Optimisation of the microwave-assisted extraction of pigments from *páprika* (*Capsicum annuum* L.) powders". *Journal of Chromatography A*, 889: 41-49, 2000.

¹⁵⁴ N. Hong, V.A. Yaylayan, G.S.V. Raghavan, J.R.J. Pare, J.M.R. Belanger. "Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from grape seed". *Natural Product Letters*, 15: 197-2004, 2001.

¹⁵⁵ M.L. Fishman, H.K. Chau, P. Hoagland, K. Ayyad. "Characterization of pectin, flash-extracted from orange albedo by microwave heating, under pressure". *Carbohydrate Research*, 323: 126-138, 2000.

Liaizid y colaboradores¹⁵⁶ han comprobado que diversos tipos de compuestos fenólicos fácilmente oxidables, resultan completamente estables en la EAM hasta temperaturas de 125 °C.

Generalmente, se utilizan disolventes orgánicos para extraer los compuestos orgánicos presentes en las matrices vegetales. En muchas ocasiones, se suele adicionar algo de agua a las muestras de extracción, ya que de esta forma las muestras pueden absorber las radiaciones de microondas más eficientemente, lo que hace que la separación de los compuestos de interés se produzca en menos tiempo. El agua también se emplea en muchas ocasiones como disolvente de extracción a la hora de extraer compuestos orgánicos solubles en agua.¹⁵⁷

Esta técnica ha sido muy poco empleada para el análisis de capsaicinoides en muestras de pimientos. Razus y colaboradores¹⁵⁸ compararon la extracción asistida por ultrasonidos, la extracción soxhlet y la extracción asistida por microondas, para la separación e identificación de los capsaicinoides presentes en distintas variedades de pimientos picantes. Estos autores no llegaron a realizar un estudio exhaustivo de extracción empleando esta técnica.

Williams y colaboradores¹⁵⁹ también estudiaron la extracción de capsaicinoides mediante la EAM. Estos autores desarrollaron un método de extracción de capsaicinoides en el cual obtuvieron como mejor disolvente de extracción la acetona. Observaron que la extracción de capsaicinoides mediante EAM se producía en tiempos inferiores que con técnicas convencionales de extracción. De todas formas el método de extracción de capsaicinoides que desarrollaron no fue muy exhaustivo, dejando muchos parámetros del método sin estudiar, como un gran número de disolventes (etanol, acetonitrilo, etc.), cantidad de muestra, volumen de disolvente, etc.

Visto que aún no existe un protocolo bien definido y exhaustivo de extracción de capsaicinoides mediante la EAM, y demostrado el gran potencial que presenta esta técnica para la extracción de compuestos naturales provenientes de plantas y alimentos en general, y de pimientos en particular, sería interesante desarrollar el estudio de todos los parámetros que puedan influir en la extracción de los capsaicinoides.

¹⁵⁶ A. Liaizid, M. Palma, J. Brigui, C.G. Barroso. "Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction". *Journal of Chromatography A*, 1140: 29-34, 2007.

¹⁵⁷ Z. Guo, Q. Jin, G. Fan, Y. Duan, C. Qin, M. Wen. "Microwave-assisted extraction of effective constituents from a Chinese herbal medicine *Radix puerariae*". *Analytica Chimica Acta*, 436: 41-47, 2001.

¹⁵⁸ A. Razus, C. Ciuculescu, M. Popescu, G. Epure. "Capsaicinoids family compounds extraction and identification by mass spectrometry". *Revista de Chimie*, 52: 635-639, 2001.

¹⁵⁹ O.J. Williams, G.S.V. Raghavan, V. Orsat, J. Dai. "Microwave-assisted extraction of capsaicinoids from capsicum fruit". *Journal of Food Biochemistry*, 28: 113-122, 2004.

I. 5. 1. 7. Extracción mediante fluidos supercríticos.

Esta técnica ha recibido mucha atención como alternativa para la preparación de muestras. La metodología se basa en el principio de que un fluido (gas) por encima de su punto crítico exhibe las propiedades de solvatación de un disolvente líquido. El fluido es supercrítico por encima de su punto crítico (figura 14). La mayor ventaja de esta técnica sobre los métodos tradicionales de preparación de muestras es el uso de fluidos supercríticos no tóxicos como el dióxido de carbono.

El fluido más utilizado en la extracción mediante fluidos supercríticos de compuestos orgánicos en general y de capsaicinoides en particular es el CO₂, aunque existe una amplia variedad de fluidos supercríticos disponibles. Además, la temperatura crítica del CO₂, que es de 31,1 °C hace a este fluido ideal para utilizarlo en este tipo de extracciones, y aun más si se trabaja con compuestos termolábiles. La presión crítica del CO₂ es de 73,8 bar, la cual es fácilmente alcanzable. El CO₂ no es tóxico ni inflamable, químicamente inerte y es más inocuo para el medio ambiente que los disolventes orgánicos. El CO₂ es un gas que está disponible en alta pureza a un bajo coste, lo que hace que su uso no sea muy costoso una vez que se tiene el equipamiento de extracción. El CO₂ presenta además una alta capacidad de solvatación, selectividad y una gran efectividad de extracción, en muchas ocasiones superiores a los métodos tradicionales que utilizan disolventes orgánicos.

Hay que destacar que la polaridad del fluido puede ser modificada apropiadamente para optimizar el aislamiento de los compuestos de interés. Otros fluidos también pueden utilizarse, especialmente el óxido nitroso, que tiene temperatura y presión crítica similares al CO₂, pero con la desventaja de ser inflamable y tóxico.¹⁶⁰

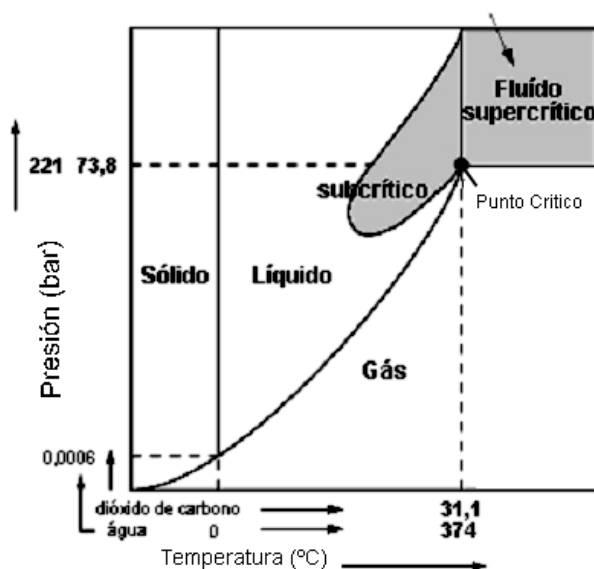


Figura 14: Diagrama de fases de sustancias puras.

¹⁶⁰ J.M.A. Araújo. "Química de Alimentos—Teoría e Prática". Imprensa Universitária. Universidade Federal de Viçosa. 1999. 416p.

Los fluidos supercríticos tienen propiedades únicas que los sitúan entre los líquidos y los gases. Sus viscosidades son mucho menores que las de los líquidos y sus tensiones superficiales son muy bajas. Por ello pueden penetrar en los poros de los sólidos mucho más fácilmente que los líquidos. Sus densidades, sin embargo, son mucho mayores que las de los gases, por lo que sus capacidades para llevar materiales disueltos son también similares a las de los líquidos.

Los fluidos supercríticos pueden ser utilizados bajo un amplio rango de condiciones, tanto por encima del punto crítico como en zonas ligeramente inferiores. En la extracción con CO₂ supercrítico, los parámetros de extracción: polaridad, composición de la mezcla y temperatura son ajustados de modo similar a una extracción convencional. Sin embargo, hay un cuarto parámetro relacionado con los anteriores, la densidad del fluido, que tiene un impacto significativo en el proceso de extracción.

La densidad y el poder de solvatación del fluido supercrítico pueden variarse cambiando la presión y temperatura, así como las velocidades de flujo, tiempos de extracción y modificadores. La eficacia de extracción con fluidos supercríticos se ve afectada por una multitud de variables, incluyendo el tipo de matriz, tipo de analito, tipo de fluido, geometría del recipiente, orientación del recipiente, tipo de restrictor, y sistema de recolección de los analitos.

El potencial de esta técnica reside en el hecho de que los parámetros físicos instrumentales pueden ser cambiados para modificar las interacciones químicas directamente. El fluido supercrítico tiene una densidad que es suficientemente elevada para proporcionar una buena capacidad disolvente pero suficientemente baja para que exista una alta difusividad y una rápida transferencia de masa a través de la matriz de las muestras.

En un estudio, Llompart y colaboradores¹⁶¹ usaron diseños factoriales para optimizar la extracción con fluidos supercríticos de fenoles y cresoles a partir de muestras de suelos. Fueron evaluadas diversas variables como el flujo de CO₂, temperatura de la cámara de extracción, el tiempo de extracción estático, la temperatura del restrictor y de la cámara colectora, la cantidad del modificador (metanol) y el tiempo de contacto entre el modificador y la muestra antes de la extracción. Se determinó que los factores más importantes en la extracción de estos compuestos son la temperatura de la cámara de extracción y la densidad del fluido.

Por otro lado, la aplicación de la extracción con fluidos supercríticos a muestras de interés alimentario es cada vez más común. La popularidad de esta técnica para estas aplicaciones puede atribuirse directamente a la eliminación de disolventes orgánicos, la alta solubilidad de la materia lipofílica en CO₂ supercrítico y a las bajas temperaturas que permiten el análisis del aroma. Valcárcel y Tena¹⁶² hacen una revisión de varias de estas aplicaciones.

¹⁶¹ M.P. Llompart, R.A. Lorenzo, R. Cela. "Optimization of supercritical fluid extraction of phenol and cresols in soil samples". *Journal of Chromatography A*, 723: 123-134, 1996.

¹⁶² M. Valcárcel, M.T. Tena. "Applications of Supercritical Fluid Extraction in Food Analysis". *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 358: 561-573, 1997.

El uso de los fluidos supercríticos para la determinación de grasas y aceites en productos alimentarios es una de las aplicaciones más destacadas. Hay diversos estudios sobre la extracción de aceites esenciales a partir de matrices vegetales. La importancia de la extracción de los aceites esenciales se debe, en parte, al alto valor añadido de estos productos tanto para la industria farmacéutica como para la de cosmética.^{163,164}

Los compuestos del aroma y otros volátiles se pueden extraer relativamente con facilidad con esta técnica, debido a la ventaja de usar temperaturas bajas y la posibilidad de concentrar fácilmente al usar CO₂, así como a la selectividad y a la posibilidad de acoplarlo directamente con el análisis por CG¹⁶⁵ o por CLAE.^{166,167}

Muchos investigadores han desarrollado métodos de extracción de capsaicinoides mediante fluidos supercríticos¹⁶⁸. Daood y colaboradores¹²⁵ estudiaron la extracción de capsaicinoides a partir de una oleoresina proveniente de pimiento páprika picante (*Capsicum annuum* L.) mediante fluidos supercríticos, utilizando para ello CO₂. La solubilidad de la oleoresina fue estudiada a temperaturas comprendidas entre 35 y 55 °C y presiones entre 100 y 400 bares. Las mejores condiciones de extracción que se observaron para los capsaicinoides fueron utilizándose presiones de 400 bares a una temperatura de 55 °C.

Del Valle y colaboradores¹⁶⁹ estudiaron la extracción de capsaicinoides del pimiento Jalapeño (*Capsicum annuum* L.) mediante fluidos supercríticos, usando para ello el CO₂. Se estudiaron presiones comprendidas entre los 120 y 320 bares a 40 °C. Como resultado se obtuvo una mayor cantidad de capsaicinoides en menos tiempo, utilizando presiones de 320 bares, observándose que a los 30 minutos, a esa presión, ya se habían extraído la mayor parte de los capsaicinoides presentes en la muestra.

Yao y colaboradores¹⁷⁰ extrajeron la capsaicina y la dihidrocapsaicina, usando la extracción mediante fluidos supercríticos (CO₂) y mediante disolventes orgánicos, de pimientos *Capsicum annuum* var. Scotch Bonnet, obteniéndose mejores resultados mediante el empleo de fluidos supercríticos.

¹⁶³ S.R.S. Ferreira, Z.L. Nikolov, L.K. Doraiswamy, M.A.A. Meireles, A.J. Petenate. "Supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil". Journal of Supercritical Fluids, 14: 235-245, 1999.

¹⁶⁴ S.R.S. Ferreira, M.A.A. Meireles. "Modeling the supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil". Journal of Food Engineering, 54: 263-269, 2002.

¹⁶⁵ L. Jublot, R.S.T. Linforth, A.J. Taylor. "Direct coupling of supercritical fluid extraction to a gas phase atmospheric pressure chemical ionisation ion trap mass spectrometer for fast separation and analysis of food components" Journal of Chromatography A, 1056: 27-33, 2004.

¹⁶⁶ Z. Wang, M. Ashraf-Khorassani, L.T. Taylor. "On-line coupling of supercritical CO₂ extraction with reversed-phase liquid chromatography for the quantitative analysis of analytes in aqueous matrices". Journal of Chromatography A, 1033: 221-227, 2004.

¹⁶⁷ M. Ashraf-Khorassani, N. Nazem, L.T. Taylor. "Feasibility of supercritical fluid extraction with on-line coupling of reversed-phase liquid chromatography for the quantitative analysis of polymer additives" Journal of Chromatography A, 995: 227-232, 2003.

¹⁶⁸ C. Duarte, M. Moldao-Martins, A.F. Gouveia, S. Beirao da Costa, A.E. Leitao, M.G. Bernardo-Gil. "Supercritical fluid extraction of red pepper (*Capsicum frutescens* L.)". Journal of Supercritical Fluids, 30: 155-161, 2004.

¹⁶⁹ M. Valle, M. Jiménez, J.C. Fuente. "Extraction kinetics of pre-pelletized Jalapeño peppers with supercritical CO₂". The Journal of Supercritical Fluids, 25: 33-44, 2003.

¹⁷⁰ J.P. Yao, M.G. Fair, A. Chandra. "Supercritical carbon-dioxide extraction of scotch bonnet (*Capsicum annuum*) and quantification of capsaicin and dihydrocapsaicin". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42: 1303-1305, 1994.

Peusch y colaboradores¹⁷¹ compararon también la técnica de extracción mediante fluidos supercríticos con la extracción empleando disolventes orgánicos, para los capsaicinoides (capsaicina, dihidrocapsaicina y nordihidrocapsaicina). Se compararon los resultados obtenidos con ambos métodos y se observó que los resultados obtenidos mediante el empleo de la extracción mediante fluidos supercríticos eran similares o incluso algo inferiores que los obtenidos con disolventes orgánicos. Desarrollaron además un método de extracción mediante fluidos supercríticos, que usaba una temperatura de extracción de 80 °C, una densidad de 0,75 g/mL y adición de modificador (agua).

Sato y colaboradores¹⁷² desarrollaron otro método de extracción con fluidos supercríticos (CO₂) para la extracción de capsaicinoides a partir de placentas de pimientos del tipo *Capsicum annuum* cv. Jalapeño. Utilizaron alícuotas de 0,1 mL de metanol como aditivo para mejorar la eficiencia de extracción. La placenta (2-80 mg) era extraída con CO₂ supercrítico durante 5 minutos a un flujo de disolvente de 5 mL/min a 40 °C y a una presión de 200 Kg/cm².

Gnayfeed y colaboradores¹⁷³ estudiaron la extracción de capsaicinoides a partir de pimientos del tipo *Capsicum annuum* L. var SZ-178 mediante esta técnica, empleando temperaturas comprendidas entre 35 y 55 °C y presiones en un rango que oscilaba entre los 100 y 400 bar. Comprobaron que las mejores condiciones para la extracción de capsaicinoides fueron 400 bares de presión y una temperatura de 55 °C. Con estas condiciones comprobaron que se recuperaba un 93 % del contenido total de capsaicinoides en la muestra. También comprobaron que la solubilidad de los capsaicinoides incrementaba 3,6 veces al subir la presión de 200 a 400 bares a la temperatura de 55 °C.

¹⁷¹ M. Peusch, E. MullerSeitz, M. Petz, A. Muller, E. Anklam. "Extraction of capsaicinoids from chillies (*Capsicum frutescens* L) and paprika (*Capsicum annuum* L) using supercritical fluids and organic solvents". Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung A-Food Research and Technology, 204: 351-355, 1997.

¹⁷² K. Sato, S. Sakamoto, Y. Goda. "Direct connection of supercritical fluid extraction and supercritical fluid chromatography as a rapid quantitative method for capsaicinoids in placentas of *Capsicum*". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47: 4665-4668, 1999.

¹⁷³ M.H. Gnayfeed, H.G. Daood, V. Illés, P.A. Biacs. "Supercritical CO₂ and subcritical propane extraction of pungent Paprika and quantification of carotenoids, tocopherols, and capsaicinoids". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49: 2761-2766, 2001.

I. 5. 2. Métodos de separación y análisis de capsaicinoides.

El primer método fiable descrito para la medición del picor debido a los capsaicinoides en los pimientos fue el test organoléptico de Scoville¹⁷⁴. Este test es usado para determinar la concentración total de capsaicinoides presentes en determinadas muestras¹⁷⁵. Está basado en la determinación de la dilución mínima necesaria que se requiere para percibir la sensación de picor.

La determinación exacta de los niveles de varios capsaicinoides se ha hecho imprescindible debido a la creciente demanda de estos productos por los consumidores tanto en alimentación como en medicinas.

De igual manera, científicos del área de genética, biogénesis y química de los alimentos, necesitan procedimientos analíticos estándar que sean reproducibles y seguros. Por ello, se necesitan métodos rápidos de separación y cuantificación de estos compuestos, los cuales son muy útiles para comparar niveles de pungencia entre diferentes muestras.

Por lo tanto, el test organoléptico de Scoville ha sido reemplazado por métodos instrumentales. Hoy en día los análisis de capsaicinoides se realizan mediante técnicas fundamentalmente cromatográficas, destacándose entre todas ellas la cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE)¹⁷⁶.

A continuación se comentarán algunas de las principales técnicas que se han empleado para la separación de los capsaicinoides para su posterior análisis.

I. 5. 2. 1. Cromatografía en capa fina.

La cromatografía en capa fina (CCF) es una técnica anterior y, a veces, complementaria de la CLAE que tiene su propia especificidad. Si bien el funcionamiento de estas dos técnicas es diferente, el principio de la separación y la naturaleza de las fases es el mismo. Al ser un método sensible, de bajo coste y con posibilidad de automatizarse, y dada su gran capacidad de tratamiento de muestras, constituye un método muy utilizado en análisis cualitativo. En los últimos años, el uso de aplicadores y densitómetros automáticos ha dado lugar a la nano-CCF, una técnica muy sensible que puede acoplarse a la espectrometría de masas.

La separación de los constituyentes de la muestra por cromatografía en capa fina se realiza sobre una delgada capa (100-200 μm) del material que constituye la fase estacionaria, generalmente compuesta por gel de sílice, depositado sobre una placa rectangular de vidrio, plástico o aluminio, de algunos centímetros de lado.

Los equipos actuales permiten controlar las tres etapas esenciales: la aplicación de la muestra, la migración sobre la placa y la medida de la concentración. La aplicación de la disolución de la muestra debe llevarse a cabo por encima del nivel del eluyente. La fase

¹⁷⁴ W.L. Scoville. "Note on capsicum". Journal of the American Pharmaceutical Association, 1: 453, 1912.

¹⁷⁵ N.C. Rajpoot, V.S. Govindarajan. "Paper chromatographic determination of total capsaicinoids in capsicums and their oleoresins with precision, reproducibility, and validation through correlation with pungency in Scoville units". Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 64: 311-318, 1981.

¹⁷⁶ P.G. Hoffman, M.C. Lego, W.G. Galletto. "Separation and quantitation of red pepper major heat principles by reverse-phase high-pressure liquid chromatography". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 31: 1326-1330, 1983.

móvil migra por capilaridad a través de la fase estacionaria, arrastrando a diferentes velocidades los constituyentes a separar. Cuando el frente de disolvente ha recorrido una distancia considerada como suficiente, se retira la placa de la cubeta, se señala la posición límite a la que ha llegado la fase móvil y se evapora ésta última.

Cuando se investiga la posición de las manchas sobre la placa, la evaporación del disolvente de elución es una ventaja. La localización de compuestos incoloros exige que estos sean “revelados”. Para facilitar su visualización, la mayor parte de las placas contienen una sal de zinc fluorescente añadida a la fase estacionaria.

Muchos han sido los autores que han utilizado esta técnica para separar capsaicinoides en distintas muestras. Rangoonwala¹⁷⁷ ya utilizó esta técnica en 1969 para separar la capsaicina y la dihidrocapsaicina. Lee y colaboradores¹⁷⁸ también utilizaron esta técnica para la separación de la capsaicina y la dihidrocapsaicina. Colocaron la disolución mezcla de capsaicina y dihidrocapsaicina (200 µg) en una placa de cromatografía en capa fina de sílica gel. Como fase móvil utilizaron una disolución del 10 % de tetralina en dietil éter junto con una disolución del 2 % de nitrato de plata en metanol en relación de volúmenes 1:1. El modelo de separación de la capsaicina y la dihidrocapsaicina fue el mismo que se obtiene mediante CLAE, obteniéndose unos factores de retención (R_f) de 0,64 y 0,59 para la capsaicina y la dihidrocapsaicina respectivamente. Mediante este método no se pudo conseguir la separación de la capsaicina y la nordihidrocapsaicina.

Suzuki y colaboradores⁹⁹ desarrollaron un método para la separación de distintos capsaicinoides (capsaicina, dihidrocapsaicina, homodihidrocapsaicina, homocapsaicina y nordihidrocapsaicina) mediante cromatografía en capa fina de alta resolución en fase inversa. El soporte utilizado fue de RP-18. La fase móvil consistía en una disolución 0,05 M en nitrato de plata y ácido bórico en 85 % de metanol. Se obtuvieron valores de factores de retención (R_f) de 0,5, 0,29, 0,24, 0,45 y 0,37 para la capsaicina, dihidrocapsaicina, homodihidrocapsaicina, homocapsaicina y nordihidrocapsaicina respectivamente.

Perucka y colaboradores³⁹ utilizaron la CCF para separar los capsaicinoides presentes en muestras de pimientos de los carotenoides. Como fase móvil utilizaron una mezcla éter etílico:acetato de etilo:metanol en proporción 75:20:5. Para la localización de los capsaicinoides en la placa, ésta se roció con una disolución de 2,6-dicloroquinona-4-cloroimida, midiendo la absorción posteriormente a una longitud de onda de 590 nm. El factor de retención que se obtuvo para los capsaicinoides fue de 0,31.

I. 5. 2. 2. Cromatografía de gases (CG).

La cromatografía de gases (CG) es una técnica muy extendida, cuyas primeras aplicaciones, que se remontan a principios de los años 40, se aplicaron al control de las fracciones ligeras de las refinerías de petróleo. Su desarrollo, que no ha parado desde entonces, se debe a su gran sensibilidad, a su polivalencia, a la rapidez de la puesta a punto de análisis nuevos y a las posibilidades de automatización, que acrecientan aún más

¹⁷⁷ R. Rangoonwala. “Beitrag zur trennung von capsaicin, ‘cis-capsaicin’, pelargonsäurevanillylamid und dihydrocapsaicin”. *Journal of Chromatography A*, 41: 265-266, 1969.

¹⁷⁸ K.R. Lee, T. Suzuki, M. Kobashi, K. Hasegawa, K. Iwai. “Quantitative microanalysis of capsaicin, dihydrocapsaicin and nordihydrocapsaicin using mass fragmentography”. *Journal of Chromatography A*, 123: 119-128, 1976.

su interés. Al requerirse que, para la separación de la columna, los compuestos deben de estar en estado gaseoso, el análisis de los líquidos o sólidos implica poder transformarlos en vapor por calentamiento. Es si duda, el principal obstáculo antes de elegir esta técnica, puesto que limita su empleo al estudio de los compuestos moleculares termoestables y suficientemente volátiles.

La cromatografía de gases es una técnica cromatográfica en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito, siendo su única función la de transportar el analito a través de la columna.

Las fases estacionarias comerciales son generalmente líquidos y raramente sólidos. Las aplicaciones son muy numerosas en todos los terrenos y los desarrollos de la cromatografía gaseosa a gran velocidad o multidimensional hacen que esta técnica sea más atractiva.

Muchos son los autores que han utilizado esta técnica para la determinación de capsaicinoides en muestras de pimientos. Debido al relativo bajo coste y a la disponibilidad de estos equipos en laboratorios de análisis o de control de calidad, esta técnica ha sido muy empleada para la cuantificación y la identificación de capsaicinoides. El análisis directo de capsaicinoides mediante cromatografía de gases no es práctico, a pesar de que haya autores que lo hayan realizado. La presencia de un grupo hidroxilo polar en los capsaicinoides y la consecuente tendencia a formar enlaces por puentes de hidrógeno, hace a estos compuestos ser poco volátiles, quedándose además fuertemente retenidos en las columnas empaquetadas de gases, produciéndose colas en los picos.

Por lo tanto es deseable transformar los capsaicinoides en compuestos volátiles derivados, que posean una mayor volatilidad que los hagan ser apropiados para una cuantificación eficaz mediante cromatografía de gases. En los primeros trabajos realizados con capsaicinoides utilizando cromatografía gaseosa, se realizaban generalmente trimetilsilaciones a los capsaicinoides para su análisis mediante esta técnica.^{178,179}

También se ha realizado, para la determinación y cuantificación de capsaicinoides, la hidrólisis alcalina de éstos, combinada con una esterificación de los ácidos grasos resultantes de la hidrólisis. Así mismo, se ha propuesto en muchas ocasiones la metilación del grupo hidroxilo de los capsaicinoides con hidróxido de trimetilanilinio.

Müller-Stock y colaboradores¹⁷⁹ desarrollaron un método para determinar de manera cuantitativa la capsaicina y los distintos capsaicinoides presentes en los pimientos. Para la determinación de los capsaicinoides realizaban previo al análisis cromatográfico una trimetilsilación de estos compuestos para mejorar la volatilidad de los capsaicinoides.

Lee y colaboradores¹⁷⁸ también utilizaron la cromatografía de gases para la determinación de capsaicinoides (capsaicina, dihidrocapsaicina y nordihidrocapsaicina). Para ello también realizaban previamente la trimetilsilación de los capsaicinoides para mejorar la volatilidad de estos compuestos.

¹⁷⁹ A. Müller-Stock, R.K. Joshi, J. Büchi. "Study of the components of capsaicin. Quantitative gas chromatographic determination of individual homologs and analogs of capsaicin in mixtures from a natural source and of vanillyl pelergonic amide as adulteration". Journal of Chromatography A, 63: 281-287, 1971.

Krajewska y Powers¹¹¹ utilizaron la cromatografía de gases para la determinación de los capsaicinoides mayoritarios presentes en las muestras naturales de pimientos (capsaicina, dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina). Para la determinación de estos capsaicinoides, se les realizaba previamente una metilación a los capsaicinoides con hidróxido de trimetilalanilinio.

Estos mismos autores¹⁸⁰ desarrollaron un método de detección y cuantificación de capsaicinoides mediante cromatografía de gases. Para ello producían una pentafluorobenzilación a los capsaicinoides, detectándolos mediante un detector de captura electrónica. La pentafluorobenzilación de los capsaicinoides hace que estos compuestos sean detectados con una gran sensibilidad en un detector de captura electrónica, llegando a detectarse cantidades inferiores a 10 pg/mL de capsaicina.

Thomas y colaboradores⁹⁶ desarrollaron un método de cromatografía de gases rápido, simple y barato para la separación de capsaicinoides, sin utilizar una derivatización de las muestras. Para la detección de los capsaicinoides utilizaron un detector termoiónico selectivo. Para la separación de los capsaicinoides sin derivatización, estos autores utilizaron una columna más polar que las convencionalmente utilizadas (14 % de cianopropilfenilo / 86 % de metilo) para que interaccione con los grupos funcionales polares de las moléculas, obteniendo así una mayor retención de los compuestos y una mejor separación. Mediante este método se han conseguido separar e identificar los cinco capsaicinoides más comunes en las muestras picantes de pimientos (capsaicina, dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina).

I. 5. 2. 3. Cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE).

Entre las técnicas cromatográficas cuya fase móvil es un líquido, la cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) es la más conocida. Su campo de aplicación cubre una gran parte del ámbito de la cromatografía de gases a la que se le añade el correspondiente al análisis de compuestos termosensibles o de aquellos con masas moleculares muy grandes o incluso polares. Su éxito se debe a la posibilidad de actuar de forma muy precisa sobre la selectividad entre los compuestos, a través de la elección de la columna y de la composición del eluyente, es decir, al sacar partido de las interacciones disolución/fase móvil/fase estacionaria.

La eficacia de las columnas es menor que en cromatografía de gases, pero la utilización de fases quirales o de nuevas fases estacionarias que actúan siguiendo varios mecanismos, aumentan aún más las posibilidades de la CLAE. En la CLAE hay constantemente una tendencia a la miniaturización, lo cual representa algunas ventajas como pueden ser: el menor consumo de disolventes, la mejora en los límites de detección y la mayor facilidad de acoplamiento a otros instrumentos, como por ejemplo la espectrometría de masas. Por otro lado también se están desarrollando equipos y materiales que acorten los tiempos de análisis, como columnas monolíticas y sistemas de presiones de trabajos mayores (UPLC).

¹⁸⁰ A.M. Krajewska, J.J. Powers. "Pentafluorobenzilation of capsaicinoids for gas chromatography with electron-capture detection". *Journal of Chromatography A*, 457: 279-286, 1988.

Las técnicas basadas en la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia, proporcionan análisis muy eficientes y exactos sobre el contenido y el tipo de los capsaicinoides presentes en los pimientos picantes. Sin embargo, es necesario optimizar métodos para cada sistema cromatográfico que se emplee a fin de identificar cada uno de los capsaicinoides, estrechamente relacionados, presentes en los extractos.

La CLAE actualmente es, sin duda, la técnica analítica más habitual para la caracterización de capsaicinoides provenientes de pimientos o de otras matrices, tal como se puede comprobar en la extensa bibliografía existente¹⁷⁶ con respecto a la identificación y análisis de estos compuestos.

Prácticamente todos los artículos publicados en los últimos 20 años sugieren el uso de la CLAE para el análisis y cuantificación de los capsaicinoides, haciendo uso de fases estacionarias apolares, adoptando casi unánimemente la cromatografía líquida en fase inversa.

Las fases estacionarias más comunes se preparan con sílice químicamente modificada conteniendo cadenas de hidrocarburos de 8 o de 18 átomos de carbono. Las cadenas constituidas por 8 átomos de carbono (C₈) se usan en mucha menor extensión que aquellas que están constituidas por 18 átomos de carbono (C₁₈).

Por otro lado, la modalidad de elución, isocrática o por gradiente, depende del grado de separación de los capsaicinoides que se quiera conseguir. Para determinaciones poco precisas del contenido total en capsaicinoides se suele utilizar métodos en isocrático. Por el contrario, cuando se pretenden obtener buenas separaciones y resoluciones entre los picos, se tiene que optar por métodos en gradiente.

Muchos son los autores que han utilizado esta técnica para la determinación de capsaicinoides en muestras de pimientos. Sticher y colaboradores¹⁸¹ desarrollaron un método para separar y determinar cuantitativamente cuatro capsaicinoides (capsaicina, dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina y homodihidrocapsaicina) en pimientos y en mezclas naturales realizadas a partir del pimiento. Para la separación cromatográfica usaron una columna de fase inversa C₁₈. Utilizaron un método en isocrático para la separación de estos cuatro capsaicinoides, usando como fase móvil una mezcla metanol-agua (53:47). Los capsaicinoides fueron separados en 40 minutos. El límite de detección para la capsaicina fue de 100 ng/mL para una señal ruido de 10:1.

Iwai y colaboradores¹⁰⁰ desarrollaron otro método para la separación de capsaicinoides (capsaicina, dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina) en muestras de pimientos. Como fase móvil utilizaron una mezcla isopropanol:n-hexano:metanol en relación (10:90:1) trabajando en isocrático y en fase normal, consiguiendo de esta manera la separación de estos cinco capsaicinoides. La resolución en la separación no fue buena, eluyendo la homodihidrocapsaicina junto con la dihidrocapsaicina y la nordihidrocapsaicina y la homocapsaicina junto con la capsaicina. De todas formas consiguieron determinar simultáneamente estos 5 capsaicinoides a niveles desde nanogramos hasta microgramos por mililitro mediante la técnica de la cromatografía de líquidos-espectrometría de masas. Todos los capsaicinoides salieron con

¹⁸¹ O. Sticher, F. Soldat, R.K. Joshi. "High-performance liquid chromatographic separation and quantitative determination of capsaicin, dihydrocapsaicin, nordihydrocapsaicin and homodihydrocapsaicin in natural capsaicinoid mixtures and *Fructus capsicin*". *Journal of Chromatography A*, 166: 221-231, 1978.

tiempos de retención inferiores a 8 minutos. Como ejemplo, la dihidrocapsaicina mostró un tiempo de retención de 6,8 minutos frente a un tiempo de retención de 7,1 minutos de la capsaicina.

Saria y colaboradores¹⁸² desarrollaron un método en fase inversa para la separación de la capsaicina y de seis análogos de ésta en tejidos de animales. Utilizaron una columna de relleno C-18. La presión de trabajo fue en torno a 240 bares a un flujo de fase móvil de 2,5 mL/min. Para la separación cromatográfica ensayaron métodos en isocrático utilizando dos tipos de disolventes. Trabajaron con mezclas metanol-agua con porcentajes de metanol del 60 al 80 % y con mezclas acetonitrilo-agua con porcentajes en acetonitrilo del 30 al 70 %.

Games y colaboradores¹⁸³ realizaron análisis de pimientos y de oleorresinas de pimientos utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas (CLAE-EM) para la determinación de los capsaicinoides mayoritarios presentes en las muestras de pimientos (capsaicina, dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina y homocapsaicina). Utilizaron la técnica en fase inversa, trabajando en isocrático. Como fase líquida para la separación cromatográfica utilizaron una mezcla de disolventes metanol-agua-ácido acético en la proporción (70:28:2).

Weaber y colaboradores¹⁸⁴ separaron, analizaron y cuantificaron los tres capsaicinoides mayoritarios (capsaicina, dihidrocapsaicina y nordihidrocapsaicina) presentes en los extractos de pimientos picantes mediante la técnica de CLAE en fase inversa. Para ello utilizaron una columna de fase inversa de relleno C-18. Como fase móvil utilizaron una disolución que consistía en 0,95 gramos de pentanosulfonato sódico en 160 mL de agua grado CLAE, 335 mL de metanol y 5 mL de ácido acético. En estas condiciones, se obtuvieron estos tres capsaicinoides perfectamente separados en menos de 20 minutos. El límite de detección de este método fue de 25 ppm.

Contreras-Padilla y Yahía⁷¹ desarrollaron un método de CLAE para la separación de capsaicinoides utilizando una columna de separación C₁₈ de fase inversa. Utilizaron para la separación de los dos capsaicinoides mayoritarios (capsaicina y dihidrocapsaicina) presentes en determinados tipos de pimientos, un método en isocrático, cuya fase móvil consistía en una mezcla metanol-agua en la relación (73:27), trabajando a un flujo de 1 mL/min. En estas condiciones se obtuvieron ambos capsaicinoides perfectamente separados, con unos tiempos de retención en torno a los tres minutos.

Kozukue y colaboradores¹⁸⁵ desarrollaron recientemente un método de separación de 8 capsaicinoides (capsaicina, DHC, h-C I, h-C II, h-DHC I, h-DHC II, nonivamida y n-DHC) en pimientos picantes y alimentos mediante el empleo de la CLAE. Utilizaron como fase móvil A el acetonitrilo y como fase móvil B agua acidificada al 0,5 % en ácido

¹⁸² A. Saria, F. Lembeck, G. Skofitsch. "Determination of capsaicin in tissues and separation of capsaicin analogues by high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*, 208: 41-46, 1981.

¹⁸³ D.E. Games, N.J. Alcock. "Analysis of pepper and capsicum oleoresins by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry and field desorption mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*, 294: 269-279, 1984.

¹⁸⁴ K.M. Weaver, R.G. Luker, M.E. Neale. "Rapid quality control procedure for the determination of Scoville heat units and the detection of chillies in black pepper, via high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*, 301: 288-291, 1984.

¹⁸⁵ N. Kozukue, J.S. Han, E. Kozukue, S.J. Lee, J.A. Kim, K.R. Lee, C.E. Levin, M. Friedman. "Analysis of eight capsaicinoids in peppers and pepper-containing foods by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 9172-9181, 2005.

fórmico. Obtuvieron separados todos los capsaicinoides en menos de 70 minutos, salvo la capsaicina y la nonivamida.

Schweiggert y colaboradores¹⁸⁶ han desarrollado un método en gradiente de separación de los capsaicinoides mayoritarios y minoritarios presentes en los pimientos. Para ello desarrollaron un método utilizando dos disolventes: 0,5 % de ácido acético en agua:acetonitrilo (90:10 v/v, disolvente A) y 0,5 % de ácido acético en agua:acetonitrilo (10:90 v/v, disolvente B). Con el método desarrollado, consiguieron separar los capsaicinoides, sin demasiada resolución en unos 20 minutos.

Columnas monolíticas

La rapidez y economía en los análisis está tomando una importancia creciente en muchas aplicaciones del área de la cromatografía líquida de alta eficacia, incluyendo análisis farmacéuticos y análisis de alimentos, a fin de aumentar el número de análisis a realizar, reduciendo costes.¹⁸⁷

Uno de los objetivos de la CLAE en las últimas décadas ha sido el desarrollo de separaciones cromatográficas rápidas¹⁸⁸. Los analistas han considerado y estudiado un gran número de factores para conseguir la reducción del tiempo de análisis. Algunos de los aspectos en que se han trabajado para reducir el tiempo de análisis, tanto en los centros de investigación como en la industria, han sido las columnas cortas con una velocidad de flujo elevado, temperaturas altas de trabajo, reducción del tamaño de partícula en el empaquetamiento y el uso de elevadas presiones.

La separación cromatográfica ideal es la de reducir el tiempo de separación sin un sacrificio significativo en la eficiencia o en la resolución de la separación en la columna. Acortando la longitud de la columna y/o incrementando la velocidad de la fase móvil que pasa por la columna, conseguimos reducir el tiempo de retención de los analitos, pero sacrificando la eficiencia en la separación. Trabajando en CLAE a alta temperatura, se reduce la viscosidad de la fase móvil, por lo que se mejora la difusividad, permitiendo trabajar a mayores velocidades de flujo, lo que permite usar columnas más largas o con un tamaño de partícula menor para incrementar la eficiencia en la separación. Sin embargo, al aumentar la temperatura en la columna, podemos producir la degradación de nuestros analitos al paso por ésta, además de la baja estabilidad que presentan a alta temperatura la mayoría de las columnas empaquetadas en base sílice, lo que hace que esta técnica no se pueda llevar a cabo eficientemente en la práctica. Mientras que el empaquetado con partículas pequeñas permite una mayor eficiencia y velocidad en la separación, al utilizar este tipo de rellenos, se incrementa altamente la presión, lo que limita su uso con bombas de CLAE convencionales. En los últimos años se vienen desarrollando equipos “caseros” de cromatografía líquida de ultra presión (ultrahigh pressure), observándose una reducción muy significativa en el tiempo de análisis manteniendo una alta eficiencia en la

¹⁸⁶ U. Schweiggert, R. Carle, A. Schieber. “Characterization of major and minor capsaicinoids and related compounds in chilli pods (*Capsicum frutescens* L.) by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry”. *Analytica Chimica Acta*, 557: 236-244, 2006.

¹⁸⁷ H.Y. about-Enein, I. Ali. “Determination of tadalafil in pharmaceutical preparation by HPLC using monolithic silica column”. *Talanta*, 65: 276-280, 2005.

¹⁸⁸ N. Wu, J. Dempsey, P.M. Yehl, A. Dovletoglou, D. Ellison, J. Wyratt. “Practical aspects of fast HPLC separations for pharmaceutical process development using monolithic columns”. *Analytica Chimica Acta*, 523: 149-156, 2004.

separación. Muy recientemente, se ha introducido en el mercado un equipo de cromatografía líquida de ultra presión ($P > 15000$ psi) (Waters ACQUITY UPLC).¹⁸⁹

Las columnas capilares empaquetadas de cromatografía líquida de alta eficacia (μ -CLAE) han sido ampliamente utilizadas en una gran cantidad de campos del conocimiento. Estas columnas proporcionan una alta eficiencia en la separación y una fácil adaptación a las muestras para el uso en la CLAE, a la vez que reducen el consumo de fase móvil, de fase estacionaria, muestra, coste de operación y contaminación generada (polución secundaria). La presión de cabeza de las columnas capilares empaquetadas de CLAE es proporcional a la longitud de la columna. A pesar de que la longitud de la columna proporciona una mayor eficiencia en la separación, la preparación de estas columnas se dificulta por la alta presión de empaquetamiento que se requiere.¹⁹⁰

Hoy en día la tendencia más desafiante en cromatografía líquida es el desarrollo de nuevos rellenos que sean capaces de separar eficientemente sustancias complicadas¹⁹¹. Dichos rellenos deberían ser capaces de trabajar en un amplio rango de pH y deberían realizar los análisis tan rápido como fuera posible, con una separación óptima de los picos, sin variarse por ello la sensibilidad ni la selectividad del análisis. Uno de estos nuevos rellenos son las columnas monolíticas¹⁸⁷ que han sido introducidas en el mercado recientemente. El uso de estas fases monolíticas estacionarias se está extendiendo al conseguir reducir los tiempos de retención de los analitos.

Las columnas monolíticas se han desarrollado como una posible herramienta para reducir el tiempo de separación en la cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa, sin sacrificar significativamente la eficiencia y resolución en la separación. Aunque las columnas monolíticas se conocen desde inicios de los años 70, sólo recientemente se ha hecho práctica y comercialmente disponible. La baja presión que se alcanza con estas columnas, les permite operar a velocidades de flujo elevadas, utilizando columnas relativamente largas, en equipos de CLAE convencionales. A las velocidades de flujo que trabajan las columnas monolíticas no se podría trabajar con columnas empaquetadas convencionales.¹⁹²

El uso de fases monolíticas estacionarias ha sido por lo tanto tomado en cuenta para reducir los tiempos de separación. Las columnas monolíticas formadas a partir de materiales orgánicos poliméricos se conocen desde inicios de los años 70, pero estos materiales presentan una gran desventaja, y es que se hinchan o se encojen cuando están en contacto con disolventes orgánicos y tienen poca estabilidad mecánica. Estos inconvenientes no están presentes en un nuevo tipo de material desarrollado, el cual está basado en un esqueleto de sílice y se prepara a través de un proceso sol-gel. El resultado es la formación de un bloque de material altamente poroso que presenta dos tipos de poros en su estructura, macroporos y mesoporos (figura 15). Los macroporos, con un diámetro aproximadamente de $2 \mu\text{m}$ y los mesoporos con un diámetro aproximado de 13 nm , dan a

¹⁸⁹ A.C.S. Wren, P. Tchelitcheff. "Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development". Journal of Chromatography A, 1119: 140-146, 2006.

¹⁹⁰ X. Shu, L. Chen, B. Yang, Y. Guan. "Preparation and characterization of long methacrylate monolithic column for capillary liquid chromatography". Journal of Chromatography A, 1052: 205-209, 2004.

¹⁹¹ L. Novakova, L. Matysova, D. Solichova, M.A. Koupparis, P. Solich. "Comparison of performance of C18 particle-packed columns in liquid chromatographic determination of estrogen and ketoprofen gel". Journal of Chromatography B, 813: 191-197, 2004.

¹⁹² T. Ikegami, N. Tanaka. "Monolithic columns for high-efficiency HPLC separations". Current opinion in Chemical Biology, 8: 527-533, 2004.

este tipo de columnas una porosidad mucho más alta que la que presentan las columnas convencionales formadas a partir de partículas empaquetadas (3-5 μm).¹⁹³

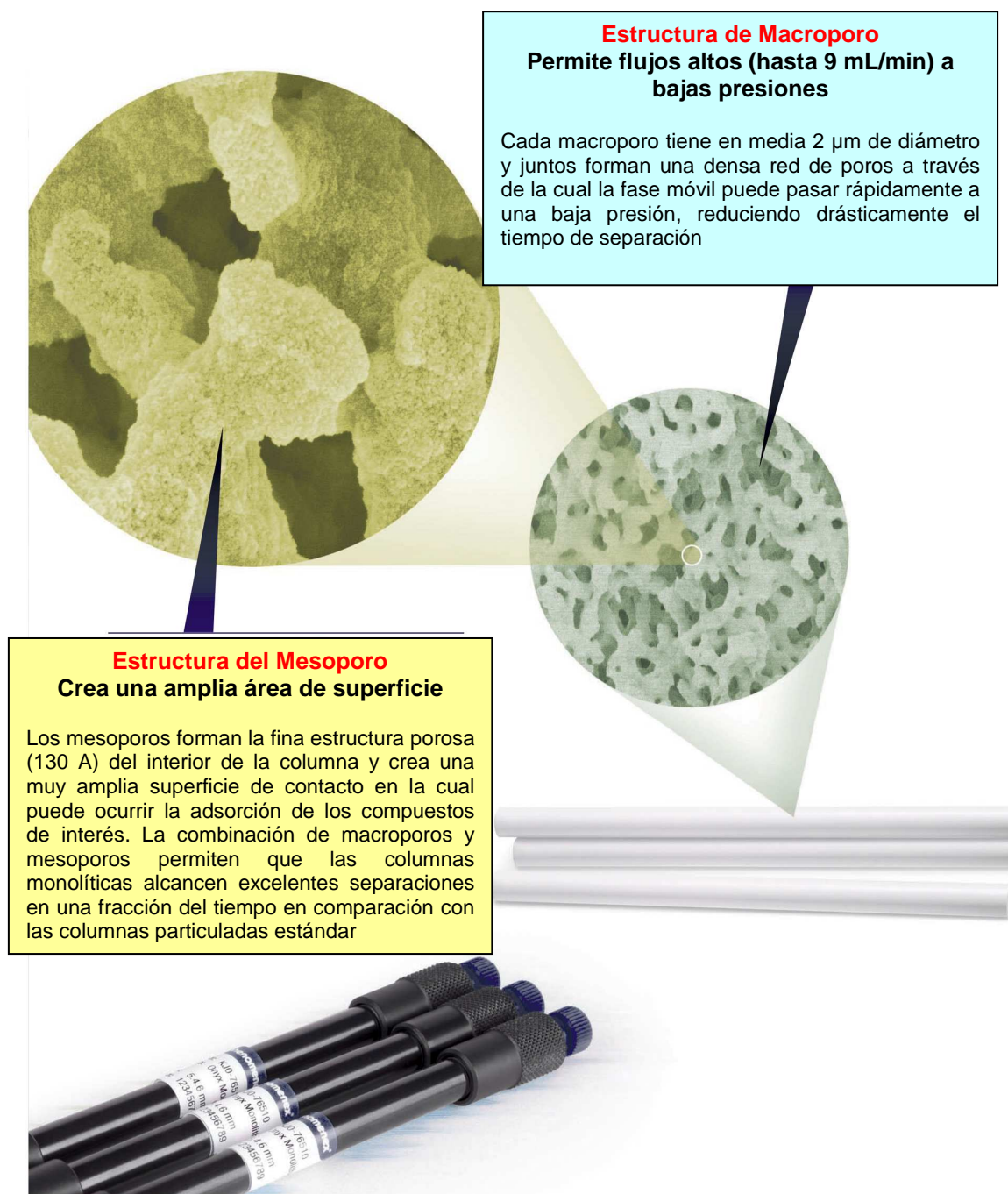


Figura 15: Estructura de las columnas monolíticas.

¹⁹³ N. Tanaka, H. Kobayashi, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, K. Hosoya, T. Ikegami. "Monolithic silica columns for high-efficiency chromatographic separations". Journal of Chromatography A, 965: 35-49, 2002.

Los poros más grandes, macroporos, son los responsables de la baja resistencia al flujo que presentan este tipo de columnas, por lo que se pueden emplear flujos altos de disolventes manteniendo presiones reducidas. Los poros pequeños, mesoporos, están altamente interconectados, formando una extensa red de canales, proporcionando un área superficial suficiente para una eficiente separación. La alta porosidad y permeabilidad de la fase estacionaria permite altos flujos de disolventes y altas eficiencias de separación debido a la óptima transferencia de masas que se produce, y a la baja presión que se alcanza en la columna. Por lo tanto, las columnas monolíticas que se han desarrollado en los últimos años poseen la ventaja de tener unas buenas características hidrodinámicas, una baja resistencia al flujo y una fácil fabricación, lo que las hace ser un soporte ideal para la elaboración de columnas.¹⁹⁴

Otra ventaja muy práctica de este tipo de columnas es el pequeño tiempo que se necesita para equilibrar la columna cuando se utiliza una fase móvil en gradiente. También es posible aplicar gradientes en la velocidad de flujo del disolvente. Esto permite que se acorten aun más los tiempos de análisis. Se ha comprobado que el uso de este tipo de columnas acorta el tiempo de análisis del orden de 3-7 veces.^{188,191}

En los últimos años el uso de este tipo de columnas se está extendiendo para el análisis de un gran número de compuestos naturales presentes en plantas y alimentos, como pueden ser compuestos fenólicos¹⁹⁵ y ocratoxina A¹⁹⁶ en vinos, fenoles en manzanas¹⁹⁷, licopeno en alimentos¹⁹⁸, *trans*-resveratrol en uvas¹⁹⁹, isoflavonas en soja²⁰⁰, etc.

Aun no se han aplicado este tipo de columnas para la separación de los capsaicinoides presentes en muestras de pimientos o en otras matrices, por lo que se hace necesario elaborar un método de separación rápido y fiable de estos compuestos mediante el empleo de estos nuevos rellenos.

I. 5. 2. 4. Extracción con fluidos supercríticos acoplada a cromatografía de fluidos supercríticos (EFS/CFS).

A pesar de que la cromatografía líquida de alta eficacia es el método analítico generalmente empleado en la determinación de capsaicinoides, se requiere generalmente con él un elevado tiempo de pretratamiento de las muestras. Además debido a que los capsaicinoides son altamente irritantes, su pretratamiento debe de realizarse muy cuidadosamente. Por todo ello se han intentado buscar nuevos métodos rápidos y seguros

¹⁹⁴ V. Pavli, V. Kmetec. "Fast separation of bacitracin on monolithic silica columns". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36: 257-264, 2004.

¹⁹⁵ M. Castellari, E. Sartini, A. Fabiani, G. Arfelli, A. Amati. "Analysis of wine phenolics by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column". *Journal of Chromatography A*, 973: 221-227, 2002.

¹⁹⁶ P. Zoeller, A. Leitner. "Application of a Chromolith SpeedROD RP18e HPLC Column: Determination of Ochratoxin A in different wines by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry". *Chromatographia*, 52: 11-12, 2000.

¹⁹⁷ F. Chinnici, A. Gaiani, N. Natali, C. Riponi, S. Galassi. "Improved HPLC Determination of Phenolic Compounds in Cv. Golden Delicious Apples Using a Monolithic Column". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 3-7, 2004.

¹⁹⁸ J. Pol, T. Hyotylainen, O. Ranta-Aho, M.L. Riekkola. "Determination of Lycopene in food by on-line SFE coupled to HPLC using a single monolithic column for trapping and separation". *Journal of Chromatography A*, 1052: 25-31, 2004.

¹⁹⁹ Z. Piñeiro, M. Palma, C.G. Barroso. "Determination of *trans*-resveratrol in grapes by pressurised liquid extraction and fast high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*, 1110: 61-65, 2006.

²⁰⁰ M.A. Rostagno, M. Palma, C.G. Barroso "Fast analysis of soy isoflavones by high-performance liquid chromatography with monolithic columns". *Analytica Chimica Acta*, 582: 243-249, 2007.

para la separación y determinación de capsaicinoides como la cromatografía de fluidos supercríticos (CFS).

La cromatografía de fluidos supercríticos, comercializada en los años 80, presenta algunas diferencias con respecto a la CG o a la CLAE. Su originalidad reside en la naturaleza de la fase móvil, que es un fluido en estado supercrítico, lo cual puede ser una ventaja para la separación de los compuestos termolábiles o de masas moleculares elevadas. Los equipos tienen un diseño híbrido entre la CG y la CLAE. La utilización de fluidos supercríticos como fases móviles en cromatografía puede presentar ciertas ventajas derivadas de sus propiedades físicas intermedias entre las de los líquidos y las de los gases.

La CFS complementa otras técnicas clásicas de cromatografía líquida y gaseosa. La migración de la disolución es consecuencia de un mecanismo de desplazamiento entre una fase estacionaria apolar y una fase eluyente poco polar. El fenómeno de retención es por tanto diferente del que ocurre en la CLAE. La utilización del CO₂ como fase móvil facilita modos de detección más elaborados como el acoplamiento con un espectrómetro de masas, espectrómetro de IR o incluso un espectrómetro de RMN.

Sato y colaboradores¹⁷² han trabajado en la técnica de extracción de capsaicinoides mediante el empleo de la extracción con fluidos supercríticos acoplada a un equipo de cromatografía de fluidos supercríticos (EFS/CFS). Este método tiene la ventaja de que no requiere un procedimiento de concentración o de filtración de la muestra, además de eliminar completamente la manipulación de la muestra.

I. 5. 3. Métodos de identificación y cuantificación de capsaicinoides.

Una vez que los capsaicinoides han sido aislados o separados, se necesitan métodos para la detección y cuantificación de éstos. Los métodos más empleados para el análisis e identificación de capsaicinoides son los que se comentan a continuación. Debido a la similitud entre los capsaicinoides y capsinoides los métodos que se utilizarán para la identificación de capsinoides serán similares a los utilizados con los capsaicinoides.

I. 5. 3. 1. Espectrometría de absorción ultravioleta-visible.

La absorción de radiación luminosa por la materia en el rango comprendido entre el ultravioleta cercano y el infrarrojo cercano, entre 180 y 1100 nm, ha sido frecuentemente estudiada desde un punto de vista fundamental. Esta región del espectro de absorción aporta poca información estructural, pero por el contrario presenta multitud de aplicaciones en análisis cuantitativo. El cálculo de concentración en esta región, mediante aplicación de la ley de Lambert-Beer, constituye la base de los métodos designados bajo el término general de colorimetría.

Este método es de gran aplicación en cualquier laboratorio de análisis, disponiéndose de una gran selección de instrumentos que comprenden desde los comparadores de color y otros colorímetros visuales simples hasta espectrómetros automáticos adaptados al análisis multicomponente. Además, la cromatografía líquida y la electroforesis capilar han

favorecido el desarrollo de detectores UV-Vis perfeccionados que constituyen un modo muy corriente de obtención de cromatogramas, con posibilidades de identificación y de cuantificación de compuestos.

Saria y colaboradores¹⁸² aplicaron esta técnica para la detección y cuantificación de capsaicinoides. Comprobaron que el máximo de absorción para los capsaicinoides se encontraba a una longitud de onda de 279 nm.

Weaver y colaboradores¹⁸⁴ cuantificaron los tres capsaicinoides mayoritarios (capsaicina dihidrocapsaicina y nordihidrocapsaicina) presentes en los extractos de pimientos picantes tras su separación mediante CLAE. Para ello utilizaron espectrometría de absorción UV-Vis midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm. Estos mismos autores²⁰¹ cuantificaron estos tres capsaicinoides midiendo la absorbancia a 200 nm. Hicieron un barrido de absorbancia a los capsaicinoides en un rango de longitudes de onda desde 195 a 305 nm. Observaron que el máximo de absorbancia para la capsaicina se encontraba a una longitud de onda de 201 nm. A 280 nm la capsaicina presentaba también un máximo relativo de absorbancia. Obtuvieron que la sensibilidad del detector a 200 nm aumentaba unas 17 veces respecto a medir a 280 nm en las mismas condiciones de detección.

Generalmente la absorbancia de los capsaicinoides es medida a una longitud de onda de 280 nm, y no a 200 nm, como se puede verificar en los trabajos publicados sobre análisis y determinación de estos compuestos mediante esta técnica^{34,59,92}. Esto es debido, a que por lo general, a estas longitudes de onda tan pequeñas (190-230 nm) el coeficiente de absorción de la fase móvil, como ocurre cuando se utiliza como fase móvil el metanol, es tan grande que enmascara los valores de la absorbancia de los compuestos de interés, por lo que se deben elegir otros máximos de absorción de los compuestos de interés a longitudes de ondas mayores, en las cuales los disolventes empleados en la fase móvil no posean absorbancia.

I. 5. 3. 2. Espectrometría de Fluorescencia.

Ciertos compuestos orgánicos e inorgánicos, puros o en disolución, en estado líquido o sólido (cristales moleculares o iónicos), emiten luz cuando se excitan mediante fotones de la región visible o ultravioleta próximo del espectro. Este fenómeno, denominado fotoluminiscencia, es el origen de la fluorimetría, una técnica selectiva y muy sensible que permite numerosas determinaciones. La intensidad de fluorescencia, relacionada con la concentración de analito, decrece de forma extremadamente rápida cuando cesa la excitación. Las medidas se realizan mediante fluorímetros o espectrofluorímetros. La fluorescencia puede utilizarse igualmente como sistema de detección de diferentes compuestos en cromatografía líquida.

Cuando se excitan compuestos en disolución mediante radiaciones luminosas en el rango del visible o del ultravioleta próximo, éstos reemiten la energía recibida total o parcialmente a modo de radiación. Según la ley de Stokes, el máximo de emisión de un compuesto fluorescente se sitúa a una longitud de onda mayor que la que corresponde al máximo de su banda de absorción. Cuando la excitación cesa, la intensidad de la radiación

²⁰¹ K.M. Weaver, D.B. Awde. "Rapid high-performance liquid chromatography method for the determination of very low capsaicin levels". *Journal of Chromatography A*, 367: 438-442, 1986.

emitida decrece exponencialmente. La sensibilidad en fluorescencia es, con frecuencia, del orden de mil veces superior a la que se obtiene en absorción UV-Vis.

En fluorescencia, la muestra a analizar se comporta como una fuente que emite en todas las direcciones. La medida de la intensidad luminosa se lleva a cabo mediante un fotomultiplicador o un fotodiodo. Generalmente se recoge la luz en una dirección perpendicular a la de la fuente primaria. Los instrumentos incluyen generalmente como fuente de excitación una lámpara de arco de xenón de 150 a 800 vatios.

Además de las moléculas que poseen fluorescencia nativa (menos del 10 % de la totalidad de compuestos), muchas pueden ser fluorescentes debido a una modificación o a una asociación con otra molécula fluorescente. La fluorescencia es frecuentemente una característica de las moléculas cíclicas, rígidas y que poseen enlaces π . Aumenta debido a la presencia de grupos electrón-donadores y disminuye con los grupos electrón-aceptores. Por el contrario, las moléculas no rígidas pierden fácilmente la totalidad de la energía absorbida por procesos de conversión externa y relajación vibracional.

Entre las aplicaciones clásicas actuales de la fluorescencia, figuran las determinaciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) en aguas de consumo mediante la CLAE. Esta técnica permite medir igualmente las aflatoxinas, así como numerosos compuestos orgánicos como la adrenalina, quinina, esteroides y vitaminas. Esta técnica también es muy utilizada para la cuantificación de los distintos capsaicinoides presentes en muestras de pimientos o en otras matrices.

Saria y colaboradores¹⁸² utilizaron esta técnica para la identificación y cuantificación de capsaicinoides en tejidos de animales, comparándola con la técnica UV-Vis. Observaron que las condiciones óptimas de excitación para los capsaicinoides eran de 270 nm, mientras que las condiciones de emisión fueron de 330 nm. Haciendo la comparación entre estas dos técnicas, se observó que el límite de detección de la capsaicina era de 3 ng/mL a una señal-ruido de 3:1 para la técnica de fluorescencia, frente a un límite de detección de 60 ng/mL a la misma señal-ruido para el detector UV-Vis recogiendo la absorbancia a 279 nm. Se concluyó que la técnica de detección mediante fluorescencia era mucho más sensible que la detección mediante detector de UV-Vis.

Lu y Cwik²⁰² determinaron la capsaicina y la zucapsaicina en suero humano mediante cromatografía líquida de alta eficacia y detección mediante espectrometría de fluorescencia. La fase móvil consistía en una mezcla de agua, acetonitrilo, tetrahidrofurano y ácido acético glacial en la relación (55:40:5:1), utilizando un flujo en isocrático de 0.8 mL/min. En estas condiciones tanto la capsaicina como la zucapsaicina se separaban perfectamente con un tiempo de retención en torno a los 15 minutos. Las condiciones de excitación que se utilizaron para estos dos capsaicinoides fueron de 270 nm y la de emisión de 300 nm. El límite de detección fue de 0,5 ng/mL para estos dos compuestos.

Daood y colaboradores¹²⁵ cuantificaron los capsaicinoides extraídos del pimiento páprika picante (*Capsicum annum* L.) mediante fluidos supercríticos mediante esta

²⁰² J. Lu, M. Cwik. "Determination of capsaicin and zucapsaicin in human serum by high-performance liquid chromatographic with fluorescence detection". Journal of Chromatography B, 701: 135-139, 1997.

técnica. La longitud de onda de excitación que se utilizó para los capsaicinoides fue de 288 nm y la de emisión de 370 nm.

I. 5. 3. 3. Espectrometría de masas.

La espectrometría de masas (EM) es un método de análisis que se basa en la determinación de masas de especies atómicas o moleculares individuales de la muestra analizada, lo que permite recabar información sobre su naturaleza, su composición, y de igual modo sobre su estructura. Los correspondientes instrumentos son los espectrómetros de masas, que se clasifican según su diseño. Los continuos perfeccionamientos de los equipos, su miniaturización, así como la aparición de nuevas técnicas de ionización, han hecho que esta técnica tenga un amplio rango de aplicación en análisis dada su polivalencia y su extrema sensibilidad.

El fundamento del método consiste en que una cantidad muy pequeña del compuesto a analizar, bajo la forma más conveniente, está ionizada. Las especies portadoras de carga eléctrica resultantes son sometidas a la acción de un campo eléctrico y/o magnético según el equipo. El estudio de las trayectorias seguidas, en un recipiente sometido al vacío, permite determinar la relación masa-carga de los iones, así como, eventualmente, su naturaleza. Este método destruye el compuesto analizado, aunque solo es necesaria una cantidad ínfima.

Esta técnica suele estar acoplada generalmente a un equipo de cromatografía líquida de alta eficacia. El acoplamiento entre la cromatografía de líquidos y la espectrometría de masas se ha convertido en una de las más poderosas herramientas para el análisis de mezclas orgánicas y bioquímicas complejas al alcance de los químicos. El mayor problema que se ha de superar con esta técnica de hibridación instrumental es que la muestra viene de la columna cromatográfica muy diluida por el líquido portador, siendo necesario eliminar la mayoría del mismo antes de su introducción en el espectrómetro de masas. Ahora bien, los avances instrumentales en este campo han sido muy importantes en los últimos años, permitiendo que el empleo de la CL-EM sea cada vez más generalizado en los laboratorios de análisis.

Esta técnica ofrece además la posibilidad de situar los espectrómetros de masas en tándem (EM/EM). Para facilitar el estudio de las fragmentaciones que siguen los compuestos moleculares se construyen espectrómetros de masas que incorporan dos o tres analizadores en serie situados en el trayecto de los iones entre la fuente y el detector. Entre estos dos analizadores se haya situada una cámara de colisión.

Lee y colaboradores¹⁷⁸ realizaron microanálisis cuantitativos de la capsaicina dihidrocapsaicina y nordihidrocapsaicina en muestras de pimientos del tipo *Capsicum annuum* usando la espectrometría de masas. Para ello realizaron el estudio de los derivados trimetilsilados de la capsaicina, dihidrocapsaicina y nordihidrocapsaicina obteniendo relaciones m/e de 377, 379 y 365 respectivamente. La separación de estos tres capsaicinoides la realizaron mediante cromatografía de gases (CG), cromatografía en capa fina (CCF) y cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE). El voltaje de ionización que utilizaron para la determinación de estos tres capsaicinoides fue de 20 eV. Mediante esta

técnica se logró cuantificar cantidades del orden de nanogramos por mililitro de estos compuestos.

Iwai y colaboradores¹⁰⁰ utilizaron también esta técnica para la realización de microanálisis simultáneos de 5 capsaicinoides (capsaicina, dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina) presentes en muestras reales de distintas variedades picantes de pimientos. También realizaron este estudio a partir de los derivados trimetilsilados de estos capsaicinoides obteniéndose relaciones m/e de 377, 379, 365, 391 y 393 para la capsaicina, dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina respectivamente. También se llegaron a cuantificar cantidades del orden de nanogramos por mililitro de estos capsaicinoides.

Games y colaboradores¹⁸³ realizaron análisis de pimientos y de oleorresinas de pimientos utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a un espectrómetro de masas (CLAE-EM) para la determinación de los capsaicinoides mayoritarios presentes en las muestras de pimientos (capsaicina, dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina y homocapsaicina). Obtuvieron que las relaciones m/e de los iones moleculares de la capsaicina, dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina y homocapsaicina fueron de 306, 308, 294 y 320 respectivamente. Como pico base se obtuvo para todos los capsaicinoides el de relación m/e de 137.

Reilly y colaboradores⁶⁷ determinaron la capsaicina, la dihidrocapsaicina y la nonivamida en los spray de autodefensa mediante la cromatografía líquida asociada a la espectrometría de masas (CL-EM) y mediante la cromatografía líquida asociada a la espectrometría de masas en tándem (CL-EM-EM). La separación cromatográfica de los capsaicinoides se realizó utilizando una columna de CLAE de fase inversa, y como fase móvil un gradiente de metanol y agua destilada, conteniendo ambos un 0,1 % de ácido fórmico. La identificación y cuantificación de los capsaicinoides fue realizada mediante la ionización en un solo paso en el espectrómetro de masas y mediante el espectrómetro de masas en tándem. Las moléculas protonadas de los capsaicinoides producían unas relaciones m/e de 306 para la capsaicina, 308 para la dihidrocapsaicina y 294 para la nonivamida. En los análisis en tándem, todos los capsaicinoides se fracturaban produciendo un ión de relación m/e de 137. Mediante CL-EM se pudo cuantificar cantidades inferiores de 10 ng/mL tanto de capsaicina, dihidrocapsaicina y nonivamida.

Garcés-Claver y colaboradores²⁰³ realizaron la determinación de los dos capsaicinoides mayoritarios (capsaicina y dihidrocapsaicina) en extractos de pimientos mediante la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas de tiempo de vuelo (TOF). El método que desarrollaron fue aplicado para la identificación y cuantificación de la capsaicina y la dihidrocapsaicina en extractos de distintas variedades de pimientos. El método desarrollado detectó con una elevada precisión concentraciones comprendidas entre 2 y 6639 mg/kg del peso seco del pimiento.

²⁰³ A. Garcés-Claver, M.S. Arnedo-Andrés, J. Abadía, R. Gil-Ortega, A. Álvarez-Fernández. "Determination of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in Capsicum Fruits by Liquid Chromatography-Electrospray/Time-of-Flight Mass Spectrometry". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 9303-9311, 2006.

I. 5. 3. 4. Espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano.

Las propiedades ópticas de compuestos, y en particular la aplicación de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS), se emplea desde la década del 70 en la industria alimenticia, farmacéutica, y petroquímica, como alternativa a los métodos químicos y químico-biológicos tradicionales^{204,205}. El NIRS se fundamenta en la quimiometría, es decir, la aplicación de las matemáticas a la química analítica. Esta técnica combina la espectroscopía, la estadística y los cálculos computacionales y genera modelos matemáticos que relacionan la composición química (presencia de grupos químicos activos) con cambios de energía en la región correspondiente al rango del infrarrojo cercano²⁰⁶. El NIRS es una técnica rápida, no destructiva ni contaminante, y de gran exactitud siempre que se sigan los procedimientos adecuados para crear las ecuaciones de calibración^{207,208}. El método utiliza la región de longitudes de onda entre los 700 y 2500 nanómetros (nm) del espectro electromagnético²⁰⁹. Este método se basa en que cuando la luz incide sobre una muestra, una parte de los fotones es transmitida a través de la misma, siendo el resto absorbido. La absorción de energía por la muestra produce que los enlaces entre C-H, O-H y N-H, componentes principales de la estructura básica de las sustancias orgánicas, vibren en distintas formas²¹⁰.

La interacción de la energía con la materia obedece a la ley de Lambert-Beer, que establece que la absorbancia a cualquier longitud de onda es proporcional al número o concentración de las moléculas absorbentes presentes en el camino recorrido por la radiación. Esto determina que para un material de naturaleza química heterogénea, el espectro obtenido en la región del infrarrojo cercano es la combinación de bandas de absorciones parciales sobrepuestas o muy cercanas, que suelen confundirse en una línea suavizada, en que se encuentran picos, valles y curvaturas en forma de hombro. Al desarrollar una calibración NIRS, la información espectral (óptica) se relaciona mediante un algoritmo con la información de la composición físico-química (método de referencia) a través de la aplicación de modelos estadísticos como son la regresión múltiple, los componentes principales y los cuadrados mínimos parciales.²¹¹

La teoría de la reflectancia difusa, sobre la que reposa el conocimiento científico de la tecnología NIRS, nos indica que, para el cumplimiento de la ley de Beer-Lambert, que en su forma más simple establece que la concentración de un determinado absorbente (analito) es directamente proporcional a la absorbancia, es absolutamente imprescindible el mantener un paso óptico constante, por diferentes razones, pero sobre todo para tratar de minimizar los fenómenos de radiación dispersa (“scatter”), fenómenos estos que en principio modifican el “paso óptico efectivo”. Un prerequisite para el mantenimiento de

²⁰⁴ K.H. Norris, R.F. Barnes, J.E. Moore, J.S. Shenk. “Predicting forage quality by infrared reflectance spectroscopy”. *Journal of Animal Science*, 43: 889-897, 1976.

²⁰⁵ D. Cozzolino, A. Fassio, A. Gimenez. “The use of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to predict the composition of whole maize plants”. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81: 142-146, 2001.

²⁰⁶ J.B. Reeves, J.S. Van Kessel. “Near-infrared spectroscopic determination of carbon, total nitrogen, and ammonium-N in dairy manures”. *Journal of Dairy Science*, 83: 1829-1836, 2000.

²⁰⁷ D. Alomar, R. Fuchslocher. “Fundamentos de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) como método de análisis de forrajes”. *Agro Sur*, 26: 88-104, 1998.

²⁰⁸ D.I. Givens, E.R. Deaville. “The current and future role of near infrared reflectance spectroscopy in animal nutrition: a review”. *Australian Journal of Agricultural Research*, 50: 1131-1145, 1999.

²⁰⁹ I. Murray. “Near infrared analysis of forages. Recent advances in animal nutrition. *Studies in the agricultural and food sciences*”. Butterworths, Reading, UK. p. 141-156, 1986.

²¹⁰ E.R. Deaville, P.C. Flinn. “Near infrared (NIR) spectroscopy: an alternative approach for the estimation of forage quality and voluntary intake. *Forage evaluation in ruminant nutrition*”. CABI Publishing, Wallingford, UK. p. 301-320, 2000.

²¹¹ D. Cozzolino. “Aplicación de la tecnología del NIRS para el análisis de calidad de los productos agrícolas”. Serie Técnica INIA 97. Editorial Hemisferio Sur, Montevideo, Uruguay. 1998.

dicho paso óptico constante es el de someter las muestras a una molienda fina y homogénea, de ahí que la bibliografía NIRS recoja numerosos trabajos que concluyen acerca de la idoneidad de utilizar molinos de tipo ciclónico y tamaños de partícula pequeños (1 mm) y, sobre todo, la recomendación de usar el mismo tamaño de molienda para el desarrollo de calibraciones y para el análisis NIRS de muestras futuras.²¹²

La preocupación por el mantenimiento de un tamaño uniforme de partícula y por el desarrollo de algoritmos de minimización de las fuentes de error causadas por diferencias en el tamaño de las mismas, ha sido una constante en los trabajos NIRS realizados en la década de los 80 y de los 90. A finales de los 90 aparecen en el mercado instrumentos NIRS dotados de módulos de análisis y cápsulas que utilizan ventanas ópticas de gran superficie y que permiten el análisis de producto intacto. Además, algunos fabricantes diseñan modelos de instrumentación que son versiones simplificadas de los monocromadores de uso más generalizado a nivel de investigación y que solo están dotados de detectores de reflexión.²¹³

Las ventajas de esta técnica incluyen el proveer información acerca de la composición química de un alimento u otro material en segundos, ser un método no destructivo, que requiere un mínimo o ningún tratamiento de la muestra, minimiza el daño ambiental y es una técnica multianalítica de alta precisión que permite predecir varios factores simultáneamente. Una vez calibrado el espectrofotómetro, el uso del NIRS redundará en bajos costos de análisis para los usuarios, por lo que, a nivel internacional, es una metodología que tiene amplia acogida.²⁰⁶

La técnica NIRS ha sido empleada para el análisis de una gran cantidad de compuestos o de determinadas propiedades en alimentos como pueden ser aspectos sensoriales en el arroz²¹⁴, calidad de zumos de fresas²¹⁵, diferenciación de variedades en el café²¹⁶ y en el té²¹⁷, compuestos fenólicos en vino²¹⁸, etc.

Esta técnica también ha sido empleada para el análisis de capsaicinoides en pimientos, pero existiendo muy pocos trabajos en la bibliografía que aborden el tema.^{219,220}

²¹² G.S. Birth, H.G. Hetch. "Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries". Williams, P.C. y Norris, K.H. (Eds.). American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul. p 1-14. 1987.

²¹³ D.L. Wetzel. "Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries". Williams, P.K. y Norris K. (Eds.). Segunda edición. American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul. p 129-144. 2001.

²¹⁴ L. Qingyun, C. Yeming, T. Mikami, M. Kawano, L. Zaigui. "Adaptability of four-samples sensory tests and prediction of visual and near-infrared reflectance spectroscopy for Chinese indica rice". Journal of Food Engineering, 79: 1445-1451, 2007.

²¹⁵ Y. Shao, Y. He. "Nondestructive measurement of the internal quality of bayberry juice using Vis/NIR spectroscopy". Journal of Food Engineering, 79: 1015-1019, 2007.

²¹⁶ I. Esteban-Díez, J.M. González-Sáiz, C. Sáenz-González, C. Pizarro. "Coffee varietal differentiation based on near infrared spectroscopy". Talanta, 71: 221-229, 2007.

²¹⁷ Y. He, X. Li, X. Deng. "Discrimination of varieties of tea using near infrared spectroscopy by principal component analysis and BP model". Journal of Food Engineering, 79: 1238-1242, 2007.

²¹⁸ D. Cozzolino, M.J. Kwiatkowski, M. Parker, W.U. Cynkar, R.G. Damberg, M. Gishen, M.J. Herderich. "Prediction of phenolic compounds in red wine fermentations by visible and near infrared spectroscopy". Analytica Chimica Acta, 513: 73-80, 2004.

²¹⁹ C.S. Samson, H. Tung-Liang, T. Berke. "Use of near infra-red reflectance to measure capsacinoids in pepper (capsicum spp.)". Capsicum Eggplant Newsletters, 16: 56-59, 1997.

²²⁰ S.M. Lee, S. Kim, J.B. Park, I.K. Hwang. "Prediction of chemical compositions for on-line quality measurement of red pepper powder using near infrared reflectance spectroscopy (NIRS)". Food Science and Biotechnology, 14: 280-285, 2005.

I. 6. SÍNTESIS DE CAPSAICINOIDES Y DE CAPSINOIDES.

I. 6. 1. Síntesis de capsaicinoides.

Introducción.

Como ya se ha comentado, los capsaicinoides son los compuestos que le dan el sabor picante al pimiento, los cuales son un grupo de amidas ácidas formados a partir de la vanillilamina y ácidos grasos de 8 a 13 átomos de carbono. Estos compuestos presentan un gran interés por numerosas razones, bien por su abundante uso en la alimentación, por sus propiedades picantes, así como por sus marcadas propiedades biológicas, siendo unos potentes compuestos antioxidantes, anti-inflamatorios, antimutagénicos, antitumorales, etc. (apartado I.3.)

Debido a la importancia tanto económica, como biológica y al elevado uso de estos productos, son muchas las metodologías de síntesis propuestas para la obtención de estos compuestos. Las metodologías de síntesis que se han propuesto son tanto químicas como enzimáticas.

Síntesis química de capsaicinoides.

La síntesis química de productos naturales es una herramienta de enorme importancia para la obtención de compuestos naturales o análogos de los mismos, cuya obtención o aislamiento de la naturaleza resulta complicada, costosa o de bajo rendimiento. Por ello en numerosas ocasiones resulta mucho más conveniente sintetizar químicamente los compuestos presentes en la naturaleza, que obtenerlos directamente de las plantas mediante extracción y aislamiento.

Los capsaicinoides son una familia de compuestos presentes en los pimientos picantes. En la bibliografía se recogen más de 20 compuestos naturales que pertenecen a esta familia. Todos ellos tienen propiedades estructurales semejantes, por lo que su separación es extremadamente compleja. Esto ha hecho que se desarrollen metodologías de síntesis para la obtención de los capsaicinoides presentes en los pimientos picantes, además de otros análogos sintéticos que presenten las mismas propiedades que los que aparecen en la naturaleza.

El primer procedimiento de síntesis de capsaicinoides fue propuesto por Nelson²²¹ en 1919. La metodología que empleó consistía en disolver una determinada cantidad de vanillilamina en éter etílico anhidro. A continuación se añadía una cantidad equimolar del cloruro de acilo correspondiente según el capsaicinoide que se quisiera sintetizar. La mezcla de reacción se mantenía en agitación bajo un calentamiento suave hasta que se completaba la reacción. La reacción se detenía añadiendo agua acidificada con ácido clorhídrico. De esta manera sintetizó un gran número de capsaicinoides de longitudes de cadena comprendidas entre 3 y 12 átomos de carbono, obteniendo rendimientos comprendidos entre el 44 y el 83 %.

²²¹ E.K. Nelson. "Vanillyl-acyl amides". Journal of the American Chemical Society, 41: 2121-2130, 1919.

Gannett y colaboradores²²² también estudiaron un método de síntesis de capsaicinoides. Desarrollaron una metodología para la formación del cloruro de acilo del ácido correspondiente de la cadena de la capsaicina y de la dihidrocapsaicina. Para ello formaban el cloruro de acilo de la cadena que se quería introducir mediante la adición de cloruro de tionilo (exceso) al ácido correspondiente. El cloruro de acilo formado se disolvía en éter etílico y se le añadían 2 equivalentes de clorhidrato de 4-hidroxi-3-metoxibencilamina disueltos también en éter etílico. La mezcla de reacción se dejaba en agitación durante 3 días a temperatura ambiente y finalmente se detenía la reacción adicionando agua (figura 16). El crudo de reacción se extraía posteriormente tres veces con éter etílico, se unían las fases orgánicas, se secaban con sulfato de sodio anhidro y se concentraba posteriormente obteniéndose el correspondiente capsaicinoide.

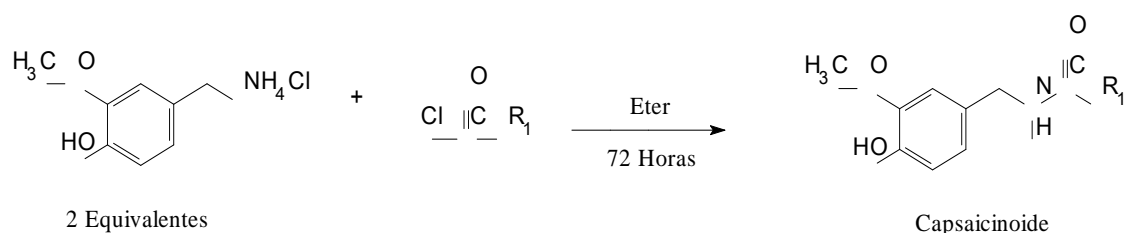


Figura 16: Esquema de síntesis de capsaicinoides propuesta por Gannett y colaboradores.

Kaga y colaboradores²²³ también sintetizaron la capsaicina de manera similar que Gannett. Primeramente realizaban la isomerización del doble enlace de la cadena lateral (Z) a su forma (E). Para ello hacían reaccionar al ácido (Z)-8-metil-6-nonenoico (7,7 g, 45,3 mmol) con una disolución 2M NaNO₂ (3,2 mL) y otra disolución 6M HNO₃ (2,15 mL) a una temperatura de 70-75 °C bajo atmósfera inerte de nitrógeno. La mezcla de reacción se mantenía bajo agitación fuerte durante 30 minutos (figura 17). Posteriormente se enfriaba la reacción, y se añadía éter etílico. A continuación, la fase orgánica se lavaba 1 vez con agua y tres veces con salmuera. Seguidamente se secaba con sulfato de sodio anhidro y se concentraba obteniéndose el ácido en su forma (E) en una proporción 8:1 con su forma (Z) con un rendimiento del 91 %. Una vez obtenido el ácido de la cadena lateral de la capsaicina en su forma (E), operaban de manera similar a Gannett para la obtención de los capsaicinoides.

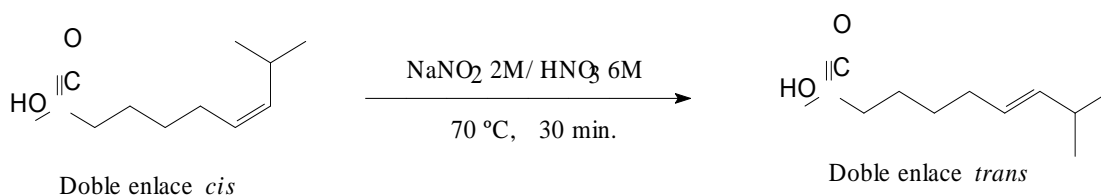


Figura 17: Isomerización del ácido (Z)-8-metil-6-nonenoico.

²²² P.M. Gannett, D.L. Ángel, P.J. Reilly, T. Lawson, J. Sharpe, B. Toth. "The capsaicinoids: their separation, synthesis, and mutagenicity". Journal of Organic Chemistry, 53: 1064-1071, 1988.

²²³ H. Kaga, M. Miura, K. Orito. "A facile procedure for synthesis of capsaicin". Journal of Organic Chemistry, 54: 3477-3478, 1989.

Recientemente se ha publicado una patente sobre la preparación y purificación de la capsaicina sintética²²⁴. En esta patente se describe todo el procedimiento de la síntesis de la capsaicina. Con respecto a la formación de la amida por acoplamiento entre el clorhidrato de la 4-hidroxi-3-metoxibencilamina con el cloruro del ácido correspondiente, se opera tal como se describe a continuación.

El clorhidrato de la 4-hidroxi-3-metoxibencilamina (13,4 g) se disuelve en dimetilformamida (40 mL) y se añade en un matraz de reacción bajo atmósfera inerte de nitrógeno. La mezcla de reacción se enfría hasta los 10 °C. Posteriormente se añade NaOH 5N (28 mL) poco a poco en baño de hielo. A continuación, la mezcla de reacción se agita magnéticamente a 20 °C durante 30 minutos y entonces se enfría hasta los 5 °C. Seguidamente se añade gota a gota ácido clorhídrico (13,3 gramos) en éter anhidro (120 mL) durante 60 minutos a 5 °C y se deja posteriormente que se alcance temperatura ambiente manteniendo la agitación magnética durante toda una noche. Transcurrido este tiempo se realiza la extracción del crudo de reacción con 3 porciones de acetato de etilo. La fase orgánica obtenida se lava 2 veces con 1N de HCl, 2 veces con NaHCO₃, 1 vez con salmuera, se seca con sulfato de sodio anhidro y se concentra a vacío. En esta reacción se obtiene un rendimiento del 65 %.

Síntesis enzimática de capsaicinoides.

Otra metodología también muy utilizada para la síntesis de compuestos naturales es la síntesis enzimática o biocatálisis. Ésta consiste en la síntesis de compuestos mediante la utilización de enzimas o complejos enzimáticos. Este tipo de síntesis suele utilizarse cuando la síntesis química resulta compleja y costosa. Las transformaciones enzimáticas se llevan a cabo, bien a través de enzimas parcialmente purificadas, o mediante células completas para la producción de un amplio número de sustancias.

Hasta hace pocos años, las empresas químicas utilizaban únicamente la biocatálisis en aquellas situaciones en las que todos los métodos químicos fallaban. Actualmente este punto de vista está cambiando y la síntesis enzimática está tomando una gran importancia.

Las biotransformaciones poseen un gran número de ventajas sobre sus correspondientes métodos químicos. Las condiciones necesarias para los procesos son suaves y en la mayoría de los casos no requieren de la protección de otros grupos funcionales. Desde un punto de vista económico, los procesos biocatalíticos son a menudo más baratos y directos que sus análogos químicos. Sin embargo, muchas de las reglas que definen las biotransformaciones no son comprendidas todavía, por lo que existen muchas reacciones químicas en las que no existe su equivalente biocatalítico.

Hay diversos autores que han empleado esta metodología sintética para la obtención de capsaicinoides.

²²⁴ S. McIlvain, W. Chen, P. Ramiya, R. Burch, R. Carter, T. Anderson. "Preparation and Purification of synthetic capsaicin". Patente: WO 2004/092122 A2

Kobata y colaboradores²²⁵ sintetizaron análogos de la capsaicina mediante la amidación de la vanillilamina con derivados de ácidos grasos mediante síntesis enzimática empleando lipasas. Para ello estudiaron un gran número de lipasas, obteniendo los mejores resultados con las lipasas Novozym 435, Lipasa AK y Lipasa PS a 70 °C y 72 horas de reacción. Los rendimientos obtenidos con estas lipasas para diferentes cadenas de ácidos grasos estuvieron comprendidos entre el 2 y el 44 %.

Estos mismos autores²²⁶ sintetizaron análogos de la capsaicina utilizando como cadenas laterales ácidos grasos naturales como los presentes en el aceite de oliva. Para ello emplearon 3 enzimas diferentes: Lipasa D, Lipasa R y Novozym 435. Los rendimientos obtenidos con ácidos grasos del aceite de oliva a 70 °C y durante 96 horas de reacción están comprendidos entre un 15,8 y un 20,3 %.

Estos mismos autores²²⁷ posteriormente han sintetizado enzimáticamente análogos de la capsaicina con diferentes cadenas laterales y utilizando como medio de reacción CO₂ supercrítico. La enzima empleada ha sido Novozym 435. Los mejores rendimientos (54 %) se han producido a una temperatura de 80 °C y a una presión de 19 MPa durante 72 horas de reacción.

Castillo y colaboradores²²⁸ han sintetizado análogos de la capsaicina de longitudes de cadena comprendidas entre 4 y 16 átomos de carbono. Para ello han utilizado la lipasa Novozym 435. La temperatura de reacción ha sido de 45 °C durante 48 horas de duración. Los rendimientos están comprendidos entre el 83 y el 97,5 % para los capsaicinoides sintetizados.

²²⁵ K. Kobata, M. Kawamura, M. Toyoshima, Y. Tamura, S. Ogawa, T. Watanabe. "Lipase-catalyzed synthesis of capsaicin analogues by amidation of vanillylamine with fatty acid derivatives". *Biotechnology Letters*, 20: 451-454, 1998.

²²⁶ K. Kobata, M. Toyoshima, M. Kawamura, T. Watanabe. "Lipase-catalyzed synthesis of capsaicin analogues using natural oils as an acyl donor". *Biotechnology Letters*, 20: 781-783, 1998.

²²⁷ K. Kobata, M. Kobayashi, S. Kimpara, T. Watanabe. "Supercritical CO₂ as a reaction medium for synthesis of capsaicin analogues by lipase-catalyzed transacylation of capsaicin". *Biotechnology Letters*, 25: 1575-1578, 2003.

²²⁸ E. Castillo, A. Torres-Gavilán, P. Severiano, A. Navarro, A. López-Munguía. "Lipase-catalyzed synthesis of pungent capsaicin analogues". *Food Chemistry*, 100: 1202-1208, 2007.

I. 6. 2. Síntesis de capsinoides.

Introducción

Como se ha comentado anteriormente los capsinoides son unos compuestos que se han descubierto e identificado muy recientemente en los frutos de la planta no picante *Capsicum annuum L.*, a la que se llamó “CH-19 Sweet”,⁸¹ la cual contenía sólo una pequeña cantidad de capsaicinoides pero por el contrario, cantidades considerables de capsinoides.

Los capsinoides únicamente se diferencian de los capsaicinoides por la unión del anillo aromático a la cadena hidrocarbonada de la molécula. Esta unión es de tipo amida en los capsaicinoides y de tipo éster en los capsinoides, como se comentó anteriormente. Esto hace que mientras que los capsaicinoides presentan unas marcadas propiedades picantes, los capsinoides carezcan de las mismas, pero mantienen las demás propiedades biológicas que presentan los capsaicinoides. Este hecho, les ha dado la importancia que actualmente presenta esta familia de compuestos.

Por lo tanto debido a las marcadas propiedades biológicas de estos compuestos y a la ausencia de propiedades picantes, estos compuestos han sido ampliamente estudiados en los últimos años. Para ello se han desarrollado distintas metodologías de síntesis, tanto químicas como enzimáticas, que se comentarán a continuación.

Síntesis química de capsinoides

Como se comentó anteriormente, la síntesis química de productos naturales es una herramienta de enorme importancia para la obtención de compuestos naturales o análogos de los mismos, cuya obtención o aislamiento de la naturaleza resulta complicada, costosa o de bajo rendimiento.

Este es el caso que se presenta con los capsinoides. Los capsinoides son compuestos que no están presentes en todas las variedades de pimientos. Estos compuestos solamente se han descrito en los frutos de la planta no picante *Capsicum annuum L.*, a la que se llamó “CH-19 Sweet”. Esta planta presenta tres tipos de capsinoides principalmente (capsiato, dihidrocapsiato y nordihidrocapsiato), cuyo aislamiento resulta enormemente dificultoso debido a la semejanza estructural que presentan estos tres compuestos. Además, en muchas ocasiones resulta necesario disponer de análogos de los compuestos naturales para ver como se modifican las propiedades biológicas al realizar modificaciones en la estructura de las moléculas. Este es el caso que se presenta con los capsinoides, habiéndose desarrollado en los últimos años diversas metodologías sintéticas de esta familia de compuestos.

Kobata y colaboradores⁸¹ sintetizaron químicamente el 8-metil-nonanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo (dihidrocapsiato). Para ello, primeramente hicieron reaccionar una mezcla de ácido 8-metilnonanoico (500 mg, 2,9 mmol) y cloruro de tionilo (3,5 g, 29 mmol) durante toda una noche a temperatura ambiente con agitación magnética y bajo sequedad con CaCl₂, para la obtención del cloruro de acilo de dicho ácido. Esta mezcla de

reacción se evaporó a presión reducida, obteniéndose un aceite marrón. Este aceite se añadió gota a gota en una disolución de 5 mL de piridina con alcohol vanílico (893 mg, 5,8 mmol). La mezcla de reacción se agitó magnéticamente durante 2 h a 0 °C (figura 18). Una vez transcurrida la reacción, se añadió agua y HCl 2N para acidificar. La mezcla se extrajo 3 veces con porciones de 30 mL de acetato de etilo y las fracciones de acetato una vez reunidas se lavaron con agua, se secaron con Na₂SO₄ anhidro y se filtraron. El filtrado se evaporó bajo vacío obteniéndose un residuo, el cual fue introducido en una columna de separación de sílica gel. La fracción eluida con n-hexano/EtOAc (90:10) dio un aceite incoloro (dihidrocapsiato, 329 mg, 36,8 % rendimiento).

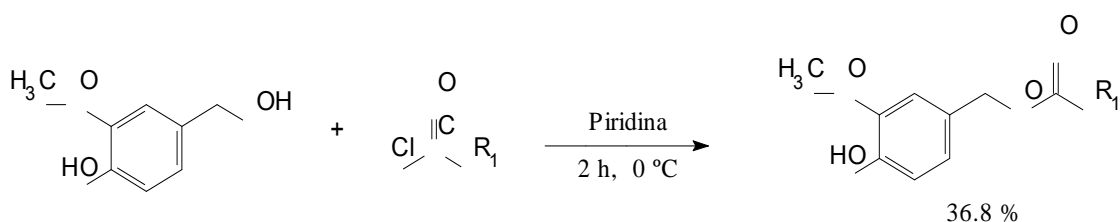


Figura 18: Esquema de síntesis de capsinoides propuesta por Kobata y colaboradores.

Sutoh y colaboradores²²⁹ sintetizaron un análogo del capsiato (nonanoato de vanillilo) para estudiar la estabilidad de los capsaicinoides en distintos disolventes. Realizaron el mismo procedimiento sintético que utilizaron anteriormente Kobata y colaboradores⁸¹. En esta ocasión el rendimiento fue tan solo del 13 %.

Appendino y colaboradores²³⁰ posteriormente han estudiado la esterificación quimioselectiva de ácidos fenólicos con alcoholes. Este tipo de reacción ha sido aplicada para la síntesis del nonanoato de vanillilo. El mejor rendimiento lo obtuvieron mediante la reacción de esterificación de Mitsunobu. Para la síntesis del nonanoato de vanillilo hicieron reaccionar al alcohol vanílico con el ácido nonanoico, utilizando como medio de reacción el tetrahidrofurano (THF) y cantidades equimolares de azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD) y trifeníl fosfina (TPP). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y durante 24 horas (figura 19). En estas condiciones, el rendimiento obtenido del nonanoato de vanillilo fue del 67 %.

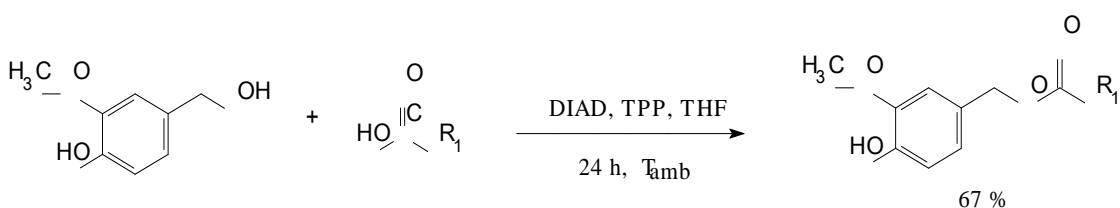


Figura 19: Esquema de síntesis de capsinoides propuesta por Appendino y colaboradores.

²²⁹ K. Sutoh, K. Kobata, T. Watanabe. "Stability of capsinoid in various solvents". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49: 4026-4030, 2001.

²³⁰ G. Appendino, A. Minassi, N. Daddario, F. Bianchi, G. C. Tron. "Chemoselective esterification of phenolic acids and alcohols". Organic Letters, 4. 3839-3841, 2002.

Macho y colaboradores⁸⁴ utilizaron este procedimiento de síntesis para la obtención del nordihidrocapsiato, obteniendo un rendimiento del 70 %.

Recientemente, Torregiani y colaboradores²³¹ han desarrollado un nuevo método para la esterificación selectiva de los alcoholes fenólicos, catalizándose la reacción mediante cloruro de cerio (III). Mediante este nuevo procedimiento de síntesis consiguieron obtener el nonanoato de vanillilo con un rendimiento del 70 %.

Síntesis enzimática de capsinoides.

Como se comentó anteriormente, la síntesis enzimática es una herramienta frecuentemente utilizada para la obtención de compuestos naturales. Hay diversos autores que han empleado esta metodología sintética para la obtención de capsinoides.

Kobata y colaboradores²³² han demostrado que los capsinoides pueden ser sintetizados enzimáticamente usando lipasas. Esta síntesis ha consistido en la esterificación del alcohol vanílico con distintos derivados de ácidos grasos, utilizando como medio de reacción disolventes orgánicos (dioxano). En este estudio se han usado 17 lipasas comerciales, observando que se obtienen mejores resultados con la lipasa “Novozym 435”, procedente de *Candida antarctica*.

Se sintetizaron mediante este procedimiento una serie de capsinoides de distinta longitud de cadena (C6-C18), con rendimientos comprendidos entre el 64 y el 86 %. Para la síntesis enzimática se partía de los ésteres metílicos de los ácidos grasos que se querían introducir en el alcohol vanílico. También se llevó a cabo la síntesis del capsiato y del dihidrocapsiato, con un rendimiento del 60 y del 59 % respectivamente.

²³¹ E. Torregiani, G. Seu, A. Minassi, G. Appendino. “Cerium(III) chloride-promoted chemoselective esterification of phenolic alcohols”. *Tetrahedron Letters*, 46: 2193-2196, 2005.

²³² K. Kobata, M. Kawaguchi, T. Watanabe. “Enzymatic synthesis of a capsinoid by the acylation of vanillyl alcohol with fatty acid derivatives catalyzed by lipases”. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 66: 319-327, 2002.

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

Como se ha comentado en el apartado anterior, los capsaicinoides, son los compuestos que le dan el sabor picante a los pimientos. Estos compuestos son ampliamente utilizados en la alimentación, bien mediante su consumo directo al utilizar los pimientos picantes en la comida o mediante otros alimentos que hayan sido preparados a partir de pimientos picantes, como pueden ser salsas y ketchups picantes, pimentones picantes, etc.

Además, los capsaicinoides son compuestos de gran interés biológico, presentando unas marcadas propiedades antioxidantes, antimutagénicas, antitumorales y anti-inflamatorios. También son unos potentes analgésicos tópicos contra dolores periféricos, estimulan el metabolismo corporal, etc. Estos compuestos están siendo empleados en preparaciones farmacológicas para el tratamiento de dolores periféricos como la artritis.

Es por ello interesante disponer de métodos de extracción rápidos, cuantitativos y reproducibles, así como del desarrollo de métodos cromatográficos de separación de capsaicinoides rápidos y fiables.

Estos métodos de extracción y de análisis se podrían utilizar para la evaluación del contenido en capsaicinoides de distintas variedades de pimientos así como de alimentos picantes elaborados a partir de pimientos. También estas técnicas serían de aplicación para el seguimiento de la evolución en el contenido en capsaicinoides durante la maduración del pimiento para determinar el momento óptimo de recogida del fruto en función del contenido en capsaicinoides que se requiera.

Debido también a la importancia biológica que presentan tanto los capsaicinoides como los capsinoides (familia de compuestos análoga a los capsaicinoides), sería necesaria la síntesis de análogos de estas dos familias de compuestos, presentando distintos valores de lipofilia, para ver cuales de estos compuestos resultan ser más activos, mediante la realización de bioensayos de carácter general.

Por todo ello, el presente trabajo tiene como objetivos principales el desarrollo de métodos de extracción y análisis de capsaicinoides, el estudio de la estabilidad de estos compuestos durante los mismos, así como el desarrollo de métodos de síntesis de los compuestos naturales y de sus análogos. Para alcanzar este objetivo se abordarán los siguientes objetivos específicos:

- El desarrollo y optimización de métodos de análisis para la determinación de capsaicinoides en pimientos y alimentos derivados de pimientos. Esta optimización consistirá en el desarrollo de nuevos métodos de análisis de capsaicinoides mediante el empleo de la cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) en fase inversa, utilizando para ello columnas C-18 convencionales y columnas monolíticas, que permiten reducir estos tiempos.

- Desarrollo de nuevos métodos de extracción que permitan la extracción y separación de los capsaicinoides de la matriz donde se encuentren. Esta extracción se deberá poder realizar de forma rápida, fiable, con el menor consumo posible de disolventes orgánicos y garantizando la estabilidad de los capsaicinoides. Para ello se evaluarán tres técnicas de extracción: la extracción asistida por microondas (EAM), la extracción asistida por ultrasonidos (EAU) y la extracción mediante fluidos presurizados (EFP).
- Se plantea además como objetivo en esta tesis doctoral, la determinación de los capsaicinoides en diversas variedades de pimientos haciendo especial hincapié en aquellas variedades cultivadas en España. De esta manera se obtendrá información de aquellas variedades que presenten unos mayores niveles de pungencia. Se buscará un método alternativo para el control de maduración que no implique la extracción y análisis cromatográfico, por lo que se evaluará la aplicabilidad de la espectroscopía NIR.
- Se pretende además determinar la evolución que presenta la concentración de capsaicinoides en los pimientos a lo largo de la maduración del fruto, así como el contenido de estos compuestos en distintas épocas de recolección en las mismas plantas. De esta manera se tendrá información del momento más apropiado para la recolección de los pimientos, dependiendo del nivel de capsaicinoides que se requiera.
- Realizar un estudio sobre el contenido en capsaicinoides presentes en los alimentos picantes, como pimentones, pimientos secos molidos, salsas, ketchups, etc. que se comercializan en España.
- Desarrollar metodologías de síntesis de capsaicinoides y “capsaicinoids like substances” (capsinoides) para realizar la síntesis de análogos de estos compuestos con diferente longitud de cadena (distinta lipofilia) para poder modificar de esta manera sus propiedades biológicas y conseguir capsaicinoides y capsinoides sintéticos con propiedades biológicas similares a los naturales, pero cuya síntesis sea simple y económica.
- Se pretende desarrollar métodos cromatográficos de análisis para la determinación de los capsaicinoides y capsinoides sintetizados, empleando para ello la cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa.
- Por último, se pretende evaluar la bioactividad de tipo general, tanto de los capsaicinoides como de los capsinoides sintetizados en el laboratorio, para ver cuáles de estos compuestos presentan mayores propiedades biológicas para ser utilizados en preparados alimenticios y farmacéuticos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS.

III. 1. REACTIVOS, DISOLVENTES Y SUSTANCIAS PATRONES.

➤ Desarrollo de métodos de extracción y de análisis de pimientos.

Se han utilizado como **patrones** de capsaicinoides, la **capsaicina** (97 %) y la **dihidrocapsaicina** (90 %) obtenida de Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemania).

Los **disolventes** utilizados en el desarrollo de la tesis doctoral han sido: **metanol**, **acetato de etilo**, **n-hexano**, **éter etílico** y **ácido acético glacial** (Merck, Darmstadt, Alemania), **etanol** y **acetona** (Panreac Química S.A. Montcada i Reixac, Barcelona, España) y **acetonitrilo** (Scharlau, Barcelona, España). Todos ellos han sido de grado HPLC.

El **agua** empleada en las extracciones y en el análisis cromatográfico ha sido obtenida mediante un sistema de purificación de agua **Milli-Q** de la casa comercial Millipore (Bedford, EE.UU.). En este sistema el agua se somete a una desionización en dos etapas a través de resinas de intercambio iónico.

El **patrón interno (P.I.)** utilizado para las correcciones de volúmenes en la cuantificación de los capsaicinoides ha sido el **2,5-dihidroxibenzaldehído**, obtenido de Sigma-Aldrich Chemie.

➤ Síntesis de capsaicinoides y capsinoides.

Cadenas carbonadas: Cloruros de acilo y ácidos:

- **Anhídrido acético** (98 %), Panreac Química S.A.
- **Cloruro de propionilo** (98 %), Sigma-Aldrich Chemie.
- **Cloruro de butilo** (98 %), Sigma-Aldrich Chemie.
- **Cloruro de pentilo** (98 %), Sigma-Aldrich Chemie.
- **Cloruro de hexilo** (99 %), Sigma-Aldrich Chemie.
- **Cloruro de heptilo** (99 %), Sigma-Aldrich Chemie.
- **Cloruro de octilo** (99 %), Sigma-Aldrich Chemie.
- **Cloruro de nonanoilo** (96 %), Sigma-Aldrich Chemie.
- **Cloruro de decanoilo** (98 %), Sigma-Aldrich Chemie.
- **Ácido undecanoico** (99 %), Acros Organics (New Jersey, USA).
- **Cloruro de dodecanoilo** (Lauroyl Chloride) (98 %), Sigma-Aldrich Chemie.
- **Ácido tridecanoico** (99 %), Sigma-Aldrich Chemie.

- **Cloruro de tetradecanoilo** (Myristoyl Chloride) (97 %), Sigma-Aldrich Chemie.
- **Cloruro de hexadecanoilo** (Palmitoyl Chloride) (98 %), Sigma-Aldrich Chemie.
- **Ácido 8-metil-nonanoico** (97 %), Acros Organics (New Jersey, USA).
- **Ácido *cis*-8-metil-6-nonenoico** (97 %), Maybridge (Tintagel, Cornwall, Inglaterra).

Otros productos y reactivos:

- **Acetato de etilo (purísimo)**, Scharlau Chemie S.A.
- **Ácido clorhídrico** (37 %), Panreac Química S.A.
- **Ácido nítrico** (65 %), Panreac Química S.A.
- **Clorhidrato de la 4-hidroxi-3-metoxi-bencilamina** (98 %), Sigma-Aldrich Chemie.
- **Cloroformo, estabilizado con etanol (purísimo)**, Scharlau Chemie S.A. (Sentmenat, Barcelona, España).
- **Cloruro de *t*-butil-dimetilsilano** (97 %), Sigma-Aldrich Chemie.
- **Cloruro de tionilo para síntesis** (> 99 %), Merk (Hohenbrunn, Alemania).
- **Cloruro sódico** (99.0-100.5 %), Panreac Química S.A. (Castellar del Vallés, Barcelona, España).
- **Etanol absoluto** (99.5 %), Panreac Química S.A.
- **Hexano, mezcla de alcanos (purísimo)**, Scharlau Chemie S.A.
- **Hidrogeno carbonato sódico (NaHCO₃)**(99.0-100.5 %), Panreac Química S.A.
- **Hidróxido de sodio** (98.0-100.5 %), Panreac Química S.A.
- **Hidruro de diisobutilaluminio (1M en Tolueno) (DIBAL)**, Sigma-Aldrich Chemie.
- **Metanol (grado-HPLC)**, Panreac Química S.A. (Castellar del Vallés, Barcelona, España).
- **Nitrito de sódio** (99 %), Merk (Darmstadt, Alemania).
- **N,N-dimetilformamida (DMF)** (99 %), Panreac Química S.A. (Castellar del Vallés, Barcelona, España).
- **Piridina** (99 %), Panreac Química S.A.
- **Sulfato de cobre (II) pentahidratado** (99.0-100.5 %), Panreac Química S.A.
- **Sulfato de magnesio anhidro** (97 %), Panreac Química S.A.
- **Tetrahidrofurano (THF)** (99.5 %), Panreac Química S.A. (Castellar del Vallés, Barcelona, España).
- **Vainillina (4-hidroxi-3-metoxi-benzaldehído)** (> 99 %), Fluka AG, Buchs SG (Switzerland).

III. 2. MÉTODO DE PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS DE PIMIENTOS.

En esta tesis doctoral se han analizado bien por separado la placenta y el pimiento, o ambas partes del pimiento a la vez, lo cual hace necesario la separación física de ambas partes de las demás partes que forman el pimiento en sí (pepitas y pedúnculo).

Los pimientos estudiados se han obtenido bien procedentes de comercios, huertos, plantas ornamentales, o del invernadero del Centro de Investigación y Formación Agraria (CIFA) de Chipiona. Una vez que se dispone de los pimientos, el siguiente paso es el de separar cada una de sus partes para posteriormente triturarlas y homogeneizarlas.

Los pimientos se separan manualmente en cada una de sus partes. Así por un lado obtenemos la placenta del pimiento que es la parte carnosa interior del pimiento bajo el raballo de éste, de la cual salen las semillas del pimiento.

En la figura 20 se representa un esquema con las partes que conforman los pimientos.

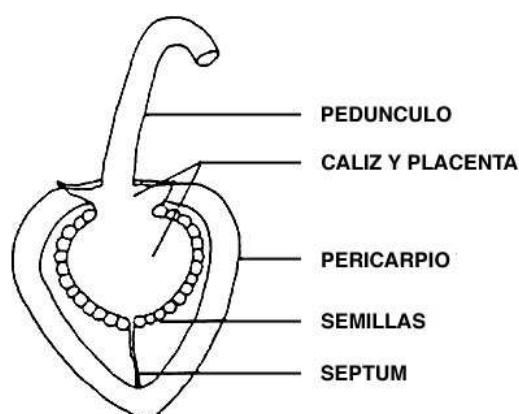


Figura 20: Esquema del pimiento.

Por otro lado se obtiene la parte carnosa del pimiento, o pimiento propiamente dicho (pericarpio), al separar las pepitas (semillas) y el raballo (pedúnculo), que son desechados.

El objeto del estudio serán la placenta y el pimiento, por lo que no interesa que las semillas y el pedúnculo del pimiento estén presentes.

El siguiente paso, una vez separadas las semillas y el pericarpio, es someter a la placenta y al pericarpio a tritutación para conseguir de esta manera una homogeneización óptima e incrementar la superficie de contacto durante la extracción. La tritutación o molienda se ha llevado a cabo mediante un molinillo de café convencional (cantidades pequeñas de pimientos) o mediante una batidora eléctrica convencional (cantidades grandes de pimientos). Se ha tenido la precaución siempre de hacer pausas de unos 30 segundos cada 60 segundos en el proceso de molienda, para no llegar a un excesivo calentamiento del molinillo o de la batidora que pudiera originar la degradación de los compuestos de interés.

Una vez que se tenían trituradas y homogeneizadas las muestras de placenta y de pimienta, éstas se guardaban en recipientes herméticos debidamente cerrados y etiquetados, que se colocaban en congeladores a $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su correcta conservación hasta el análisis.

III. 3. APARATOS E INSTRUMENTOS.

III. 3. 1. Técnicas de extracción.

➤ Extracción mediante fluidos presurizados (EFP).

En este trabajo se ha llevado a cabo el desarrollo de un método de extracción de capsaicinoides mediante el empleo de la extracción mediante fluidos presurizados.

Las extracciones realizadas por el método de extracción con fluidos presurizados fueron llevadas a cabo en un sistema de extracción ASE modelo 200 (“Accelerated Solvent Extractor®”, Dionex, Sunnyvale, California, EE.UU.).



Figura 21: *Extractor mediante fluidos presurizados ASE 200 (Dionex).*

El sistema central consta de:

☞ **Un panel de control** para seleccionar las condiciones de la extracción y el funcionamiento del equipo.

☞ **Dos carruseles giratorios** para la colocación de las cámaras de extracción (de acero inoxidable, disponibles en tamaños de 11, 22 ó 33 mL de capacidad) y de los viales de recolección (de 40 ó 60 mL de capacidad).

☞ **Un compartimento**, donde se encuentran los indicadores de presión del disolvente, de compresión del horno y del sistema de N₂, así como un vial para recoger residuos.

☞ Una zona donde se encuentra el **horno** y el **brazo automático** que recoge la cámara de extracción, la lleva hasta el horno y la vuelve a depositar en el carrusel una vez finalizada la extracción.

☞ Un **mecanismo de aguja** que accede al vial de recolección y atraviesa el septum del mismo, permitiendo recoger el extracto que llega desde la cámara de extracción

El esquema de funcionamiento de este equipo es el siguiente:

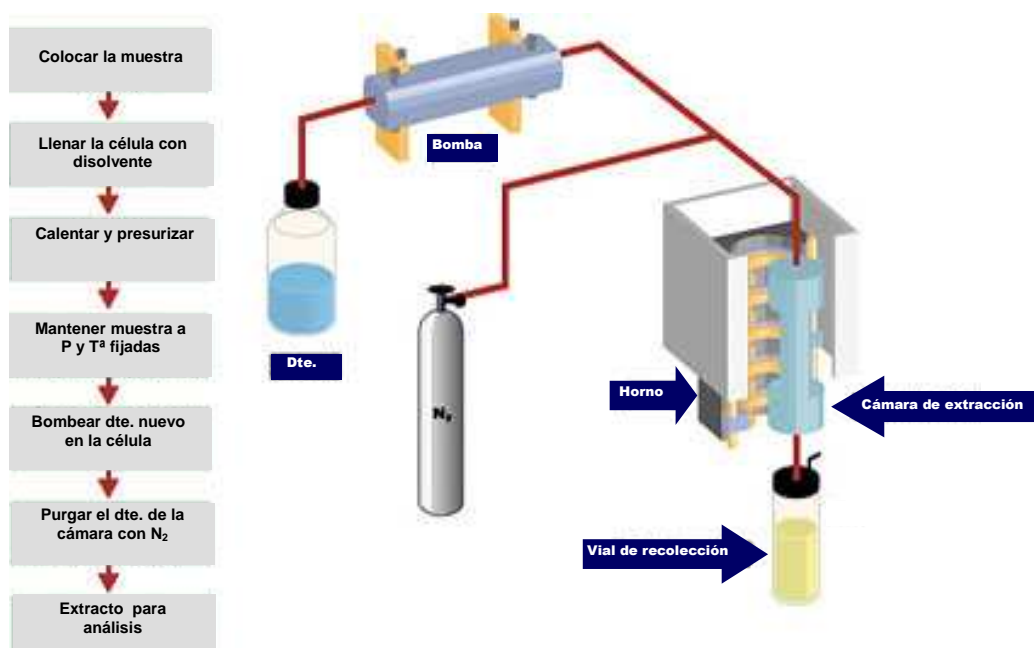


Figura 22: Diagrama de funcionamiento del extractor ASE 200.

Procedimiento de extracción:

La cámara de extracción se prepara de la siguiente forma:

☞ En primer lugar se enrosca la tapa de la parte inferior de la cámara y se coloca un filtro.

☞ Se añade como material soporte arena de mar, llenándose la cámara hasta aproximadamente la mitad de su capacidad. La arena también es empleada para rellenar la cámara para disminuir la cantidad de disolvente consumido durante la extracción.

☞ Se adiciona la muestra y se añade más arena hasta que se llene la cámara, cerrando posteriormente la misma con la tapa superior.

☞ Una vez preparada la cámara o célula de extracción, se define el método de extracción a utilizar. Para ello se fija cual va a ser la temperatura de extracción, la presión, la duración y número de ciclos de extracción, el volumen y el disolvente de lavado además de la duración de la purga y del secado.

El proceso de extracción tiene lugar, entonces, de la siguiente forma:

☞ Se introduce la cámara en el horno, se presurizan las tapas, se llena la cámara con el disolvente elegido y es calentada durante los 5 ó 7 minutos predeterminados por el equipo dependiendo de si se calienta a temperaturas inferiores o superiores a 150 °C respectivamente.

☞ Comienza el primer ciclo de extracción y se desarrolla una extracción en estático.

☞ Después de cada ciclo de extracción se deja pasar disolvente, recogiendo el extracto en el vial, volviendo a llenarse la cámara seguidamente y comenzando el siguiente ciclo estático.

☞ Tras completarse el número de ciclos de extracción definidos, se lleva a cabo la purga con N₂, con el fin de arrastrar los posibles restos de disolvente que hubieran quedado en la célula, recogiendo todos los efluentes en el mismo vial.

☞ Se descomprime la célula y se devuelve al carrusel, finalizando el método con un lavado de los conductos con el disolvente empleado (el cual se desecha).

☞ Una vez que obtenemos el extracto, el volumen se completa en un matraz aforado de 50 mL en nuestro caso. El extracto resultante es posteriormente filtrado a través de un filtro de jeringa de nylon (0,45 µm) antes de su análisis en el cromatógrafo de líquidos.

➤ **Extracción asistida por microondas (EAM).**

Así mismo se ha llevado a cabo el desarrollo de un método de extracción de capsaicinoides mediante el empleo de la extracción asistida por microondas (EAM).

Las extracciones realizadas durante el desarrollo del método de extracción asistida por microondas se llevaron a cabo en un equipo **ETHOS 1600 Advanced Microwave Labstation** de **Milestone** (Shelton, CT, EE.UU.).



Figura 23: *Equipo de extracción asistida por microondas ETHOS 1600.*

El sistema cuenta con:

- ☞ Un **panel de control** para seleccionar las condiciones de la extracción y el funcionamiento del mismo.
- ☞ Un **carrusel giratorio** para la colocación de hasta 10 cámaras de extracción.
- ☞ Un **sistema de agitación magnética** acoplado al sistema de extracción.
- ☞ Un **sistema de seguridad** de sobre-presión de la cámara de extracción.
- ☞ Un **software** de control del equipo denominado “**EasyWave**”.

En la figura 24 se presenta un diagrama del equipo ETHOS 1600.

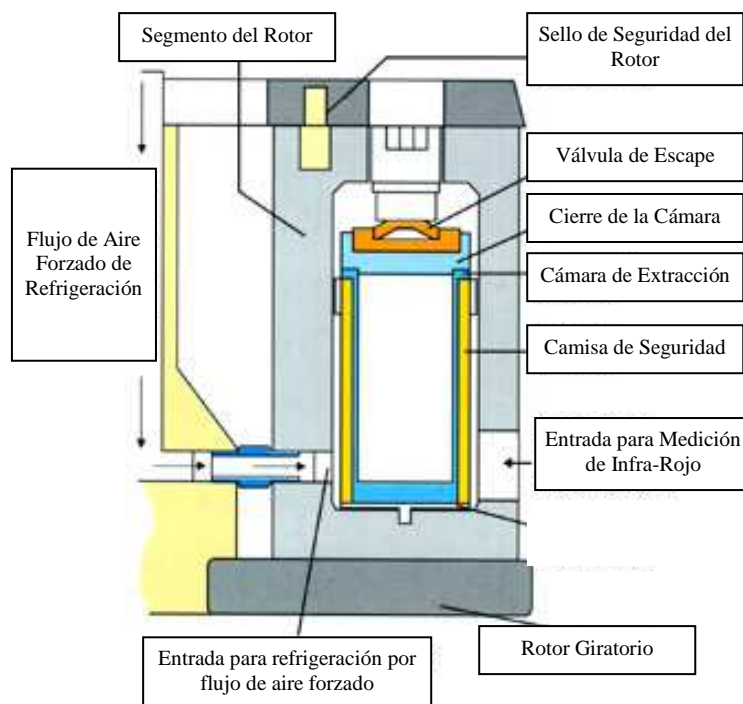


Figura 24: Diagrama del equipo de extracción asistida por microondas Ethos 1600.

➤ **Extracción asistida por ultrasonidos (EAU).**

También se ha llevado a cabo el desarrollo de un método de extracción de capsaicinoides mediante el empleo de la extracción asistida por ultrasonidos (EAU).

El desarrollo del método se ha llevado a cabo en un **baño de ultrasonidos de 360 W** (J.P. Selecta, Barcelona, España). Este equipo es empleado comúnmente en los laboratorios y permite realizar varias extracciones de forma simultánea (hasta 12). Las extracciones fueron llevadas a cabo a temperatura constante por medio de un controlador de temperatura acoplado al baño de ultrasonidos que permite la renovación del agua dentro del baño.

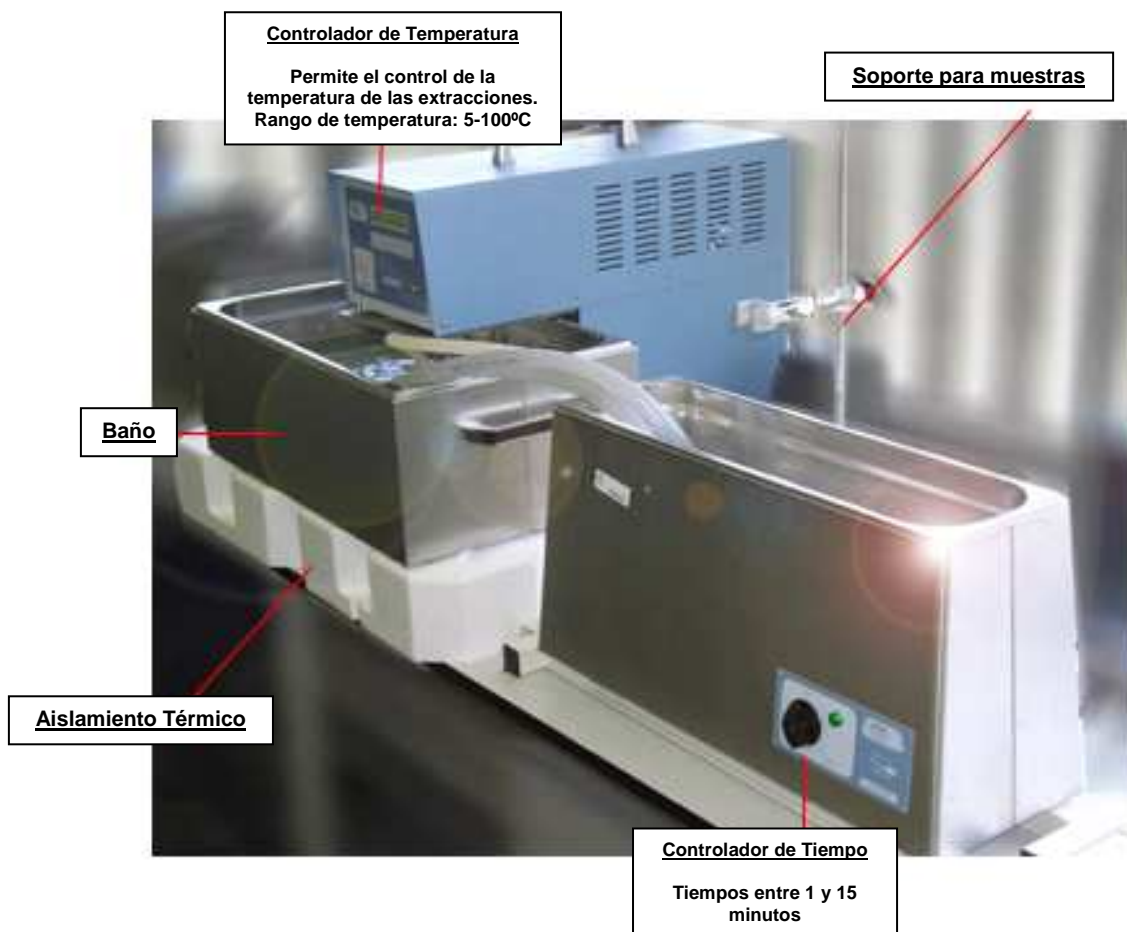


Figura 25: Baño de ultrasonidos.

III. 3. 2. Técnicas cromatográficas.

➤ Equipo de cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) Dionex.

Para los análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) de los extractos obtenidos a partir de los diferentes métodos de extracción estudiados y de las disoluciones patrones empleadas, se ha empleado un equipo **cromatográfico de líquidos Summit (Dionex)**.

Este sistema está compuesto por:

- ☞ **Bomba cuaternaria** y sistema de degasificación a vacío, modelo **P-680**.
- ☞ Un **soporte de disolventes**, modelo **SOR-100**.
- ☞ Un **inyector automático**, modelo **ASI-100**.

- ☞ Un **horno para columna**, modelo **TCC-100**.
- ☞ Un **detector UV-Vis** de matriz de fotodiodos alineados, modelo **PDA-100**.
- ☞ Un **detector de Fluorescencia**, modelo **RF-2000**.
- ☞ Una **interfaz cromatográfica universal**, modelo **UCI-50**.
- ☞ Un **software** de control e integración de datos cromatográficos, denominado **“Chromeleon 6.60”**.



Figura 26: *Equipo Summit de cromatografía líquida de alta eficacia (Dionex).*

➤ **Equipo de cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) Waters.**

También se ha empleado un equipo de cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) de Waters para el análisis de los extractos obtenidos a partir de los diferentes métodos de extracción estudiados y de las disoluciones patrones empleadas.

Este sistema se compone de:

- ☞ **Bomba cuaternaria**, modelo 616.
- ☞ **Controlador de bombas**, modelo 600S.
- ☞ **Inyector automático**, modelo 717.
- ☞ **Detector UV-Vis** de matriz de fotodiodos alineados, modelo 996.
- ☞ **Detector de fluorescencia**, modelo 2475.
- ☞ **Ordenador personal** para soportar el software de control e integración de datos cromatográficos, denominado “**Estación Millenium 2010**”.

Durante los análisis se ha burbujeado en las botellas de disolvente 60 mL/min de helio para la desgasificación de la fase móvil.

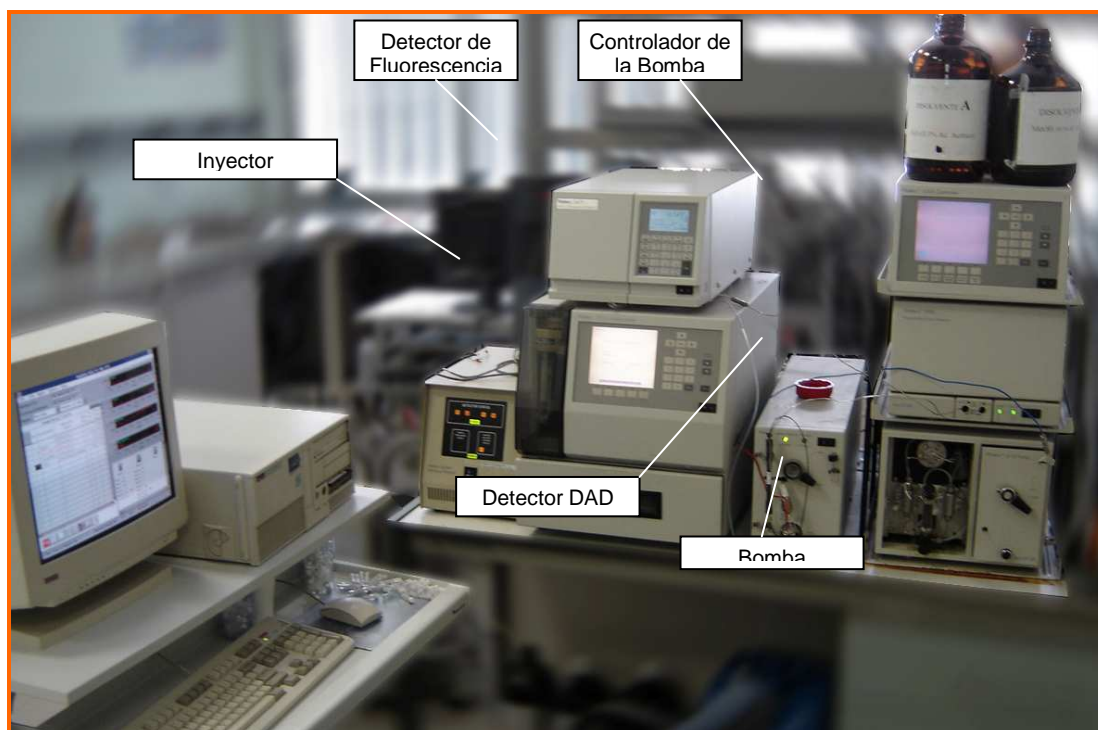


Figura 27: Equipo Waters de cromatografía líquida de alta eficacia.

➤ **Equipo de cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (CL/EM).**

La identificación de los capsaicinoides presentes en los pimientos y en los extractos de los mismos, se ha realizado mediante la técnica de cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (CL/EM).

Estos análisis han sido llevados a cabo en un sistema **Finnigan LCQ™** acoplado a un sistema de cromatografía líquida de **Finnigan MAT** (Thermo Electron Co., San José, EE.UU.). Este equipo consta de una bomba de gradientes Spectra SYSTEM 2000 (Thermo Separation Products, EE.UU.) y un detector de masas (modelo LCQ) que se compone de una interfase de electrospray y de un analizador de trampa iónica. El software empleado para el control del equipo y adquisición de datos fue **Xcalibur, versión 1.2**.

Para los análisis se han inyectado 10 µL de muestra. Las condiciones de la interfase fueron: modo positivo de ionización; temperatura del capilar: 220 °C; voltaje del spray: 4,6 kV; voltaje capilar: -5 V; caudal de gas: 80 (unidades arbitrarias); caudal de gas auxiliar: 10 (unidades arbitrarias). Los espectros de masas fueron adquiridos en un rango m/e de 50-400.



Figura 28: *Equipo de cromatografía líquida acoplado a la espectrometría de masas Finnigan LCQ™.*

➤ **Columnas cromatográficas empleadas.**

Han sido dos los tipos de columnas empleadas para el desarrollo de los métodos de análisis de los capsaicinoides en pimientos, ambas columnas de fase inversa.

☞ **Columna C-18: Phenomenex, Luna** (150 mm x 30 mm, 5µm).

Con esta columna se ha desarrollado un método de separación de capsaicinoides trabajando a un flujo de disolventes óptimo de 0,8 mL/min. y a una temperatura de 35 °C.

☞ **Columna monolítica: Chromolith Performance RP-18e** (100 mm x 4,6 mm).

Con esta columna se ha desarrollado un método de separación de capsaicinoides trabajando a un flujo de disolventes óptimo de 6 mL/min. y a una temperatura de 30 °C.

III. 3. 3. Espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS).

Se ha desarrollado un método para la cuantificación de los capsaicinoides totales y de la capsaicina y dihidrocapsaicina por separado presentes en los pimientos frescos mediante el empleo de la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano, por calibración del equipo NIRS con muestras anteriormente analizadas por CLAE.

Estos análisis han sido llevados a cabo en un equipo **FOSS XDS Rapid Content™ Analyzer** con tecnología XDS de infrarrojo cercano (FOSS Analytical, Hilleroed, Dinamarca). El software empleado para el control del equipo y adquisición de datos fue el programa **WinISI III Calibration Software (Infrasoft Internacional)** e **ISIScan™ Routine Analysis Software**.



Figura 29: *Equipo de espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) FOSS XDS Rapid Content™ Analyzer.*

III. 3. 4. Resonancia magnética nuclear (RMN).

Para la identificación y asignación de los capsaicinoides y capsinoides sintetizados se ha empleado la técnica de resonancia magnética nuclear (RMN). Se han llevado a cabo estudios de protón (^1H -RMN), de carbono (^{13}C -RMN) y experimentos COSY.

- ☞ **Espectros ^1H -RMN:** Fueron realizados en equipos **Varian, Gemini-300 e Inova-400**, utilizando como disolvente cloroformo deuterado. Los desplazamientos químicos se expresan en δ (ppm) y las constantes de acoplamiento en hertzios (Hz). Los valores de δ están referenciados respecto del pico residual del cloroformo a δ 7,25 ppm.
- ☞ **Espectros ^{13}C -RMN:** Fueron realizados en equipos **Varian, Gemini-300 e Inova-400**, utilizando como disolvente cloroformo deuterado. Los desplazamientos químicos se indican en unidades δ (ppm) referenciados respecto al pico central del cloroformo a δ 77,0 ppm.
- ☞ **Espectros COSY:** Fueron realizados en el equipo **Varian (Inova-400)** con el producto disuelto en cloroformo deuterado.



Figura 30: *Equipo de RMN Varian (Inova-400). Servicios Centrales de Ciencia y Tecnología de la Universidad de Cádiz.*

III. 3. 5. Otros equipos y materiales.

☞ **Cromatografía en capa fina (CCF):** Se han realizado en placas Alugram Sil G/UV₂₅₄ (Merck) de 0,25 mm de espesor con indicador fluorescente. El revelado de las placas de cromatografía se realizó utilizando una lámpara de UV (longitud de onda de emisión: 254 y 360 nm). Los reveladores utilizados han sido *oleum* (ácido sulfúrico, agua y ácido acético (1:4:20)) y anisaldehído (etanol (96 %), anisaldehído, ácido sulfúrico y ácido acético (75:25:5:1)) y posterior calentamiento a 150 °C.

☞ **Cromatografía en columna (CC):** Se realizó empleando gel de sílice Merck de tamaño de grano 0,06-0,2 mm como fase estacionaria, llevándose a cabo todas las separaciones en fase normal. Los eluyentes utilizados han sido distintas mezclas de hexano, acetato de etilo (AcOEt), metanol y cloroformo, según el caso.

☞ **Equipo de concentración a vacío** que consta de un rotavapor Büchi R-114 y de un baño termostático de agua B-480 (Switzerland).

☞ **Balanzas** Mettler PL200 y Mettler AE240 (Switzerland).

☞ **Balanza** Explorer OHAUS (Switzerland).

☞ **Equipo de desionización de agua**, Water-Millipore, modelo Milli-Q⁵⁰.

☞ **Turbo-Vap II** de Zymark para la concentración de los extractos mediante un baño de temperatura fijada y una corriente de N₂.

☞ **Agitador magnético** SM4, Stuart Scientific, Reino Unido.

☞ **Molinillo** convencional de café.

☞ **Batidora** convencional.

III. 4. Identificación de capsaicinoides.

III. 4. 1. Espectroscopia UV-Vis.

Los espectros UV-Vis de los capsaicinoides estudiados (nordihidrocapsaicina, capsaicina, dihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina) han sido obtenidos en el equipo de CLAE de Waters.

Los espectros obtenidos para la capsaicina y para la dihidrocaosaicina (figuras 31 y 32) son similares a los obtenidos para la nordihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina. Se observa que el máximo de absorción de los capsaicinoides se encuentra a una longitud de onda de 278,8 nm, tal como se recoge en la bibliografía.

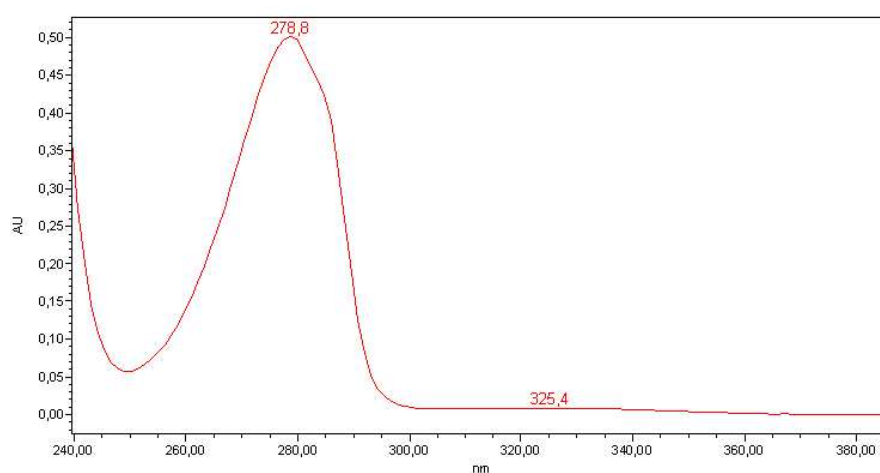


Figura 31: *Espectro de absorción UV de la capsaicina.*

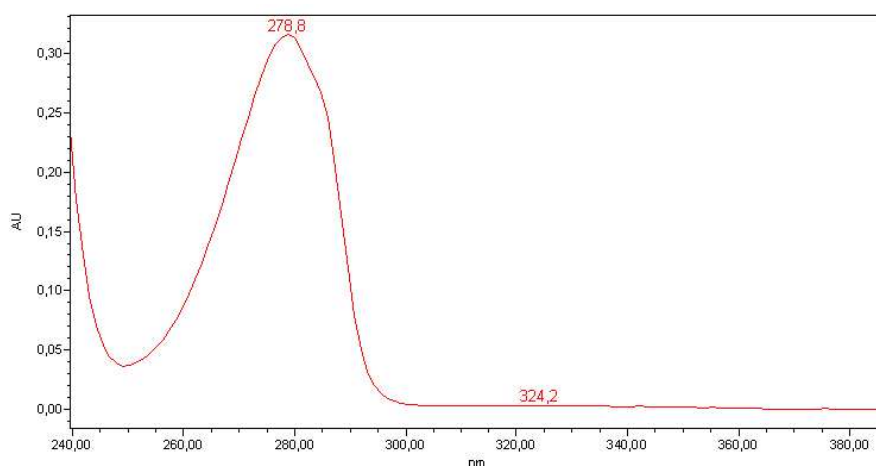


Figura 32: *Espectro de absorción UV de la dihidrocapsaicina.*

III. 4. 2. Espectrometría de masas.

Los capsaicinoides estudiados han sido identificados mediante la técnica de la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (CL/EM). El equipo utilizado para ello ha sido el sistema Finnigan LCQ™ comentado anteriormente. Los espectros obtenidos para estos capsaicinoides se exponen a continuación.

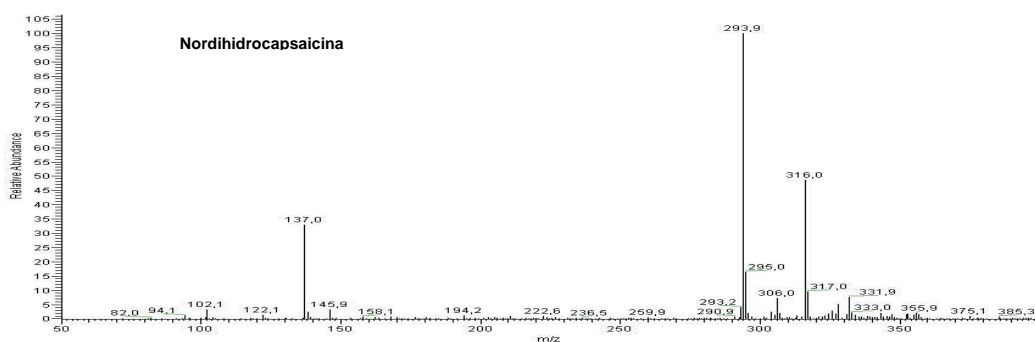


Figura 33: Espectro de masas de la nordihidrocapsaicina.

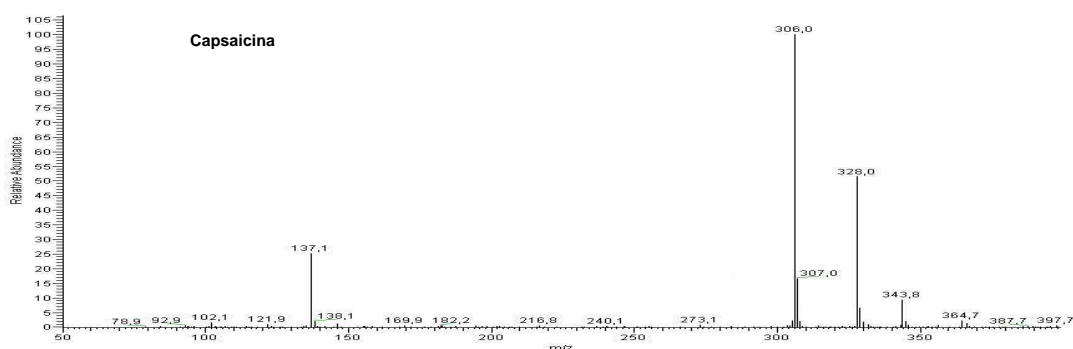


Figura 34: Espectro de masas de la capsaicina.

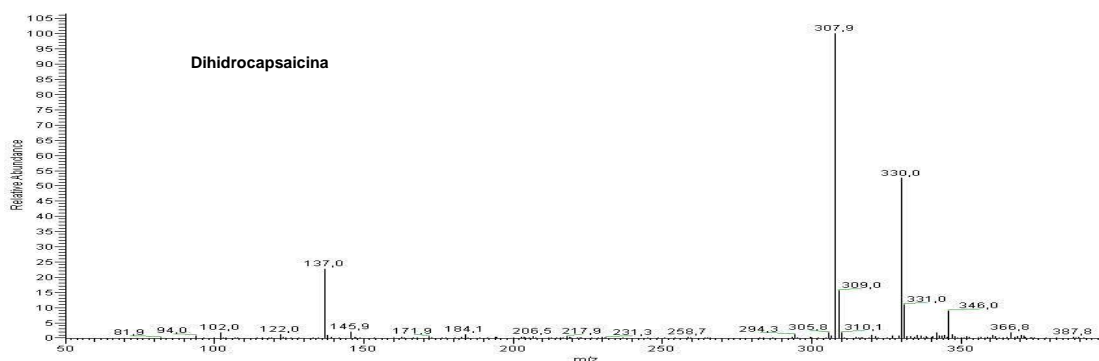


Figura 35: Espectro de masas de la dihidrocapsaicina.

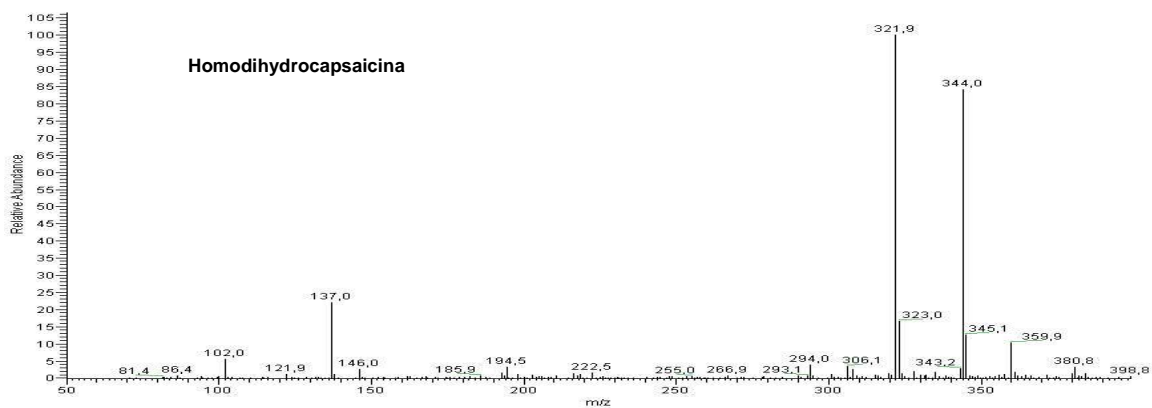


Figura 36: *Espectro de masas de la homodihidrocapsaicina.*

III. 4. 3. Resonancia magnética nuclear.

Los capsaicinoides y capsinoides sintetizados han sido identificados mediante la técnica de resonancia magnética nuclear (RMN). Los espectros obtenidos han sido realizados en los equipos Varian, Gemini-300 e Inova-400, comentados anteriormente.

Los espectros de protón ^1H -RMN y de carbono ^{13}C -RMN de los capsaicinoides y capsinoides sintetizados, así como los de los productos intermedios, aparecen en el anexo I.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

IV. 1. DESARROLLO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA LA SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CAPSAICINOIDES EN PIMIENTOS.

En éste primer capítulo se abordará el desarrollo de métodos cromatográficos para la separación y análisis de los 5 capsaicinos mayoritarios (nordihidrocapsaicina, capsaicina, dihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina) presentes en los pimientos picantes.

Respecto al desarrollo de métodos cromatográficos de extracción, se ha empleado la cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) en fase inversa mediante detección de fluorescencia. Se han empleado dos tipos de columnas para el desarrollo de los métodos:

- **Columna C-18** convencional: **Phenomenex, Luna** (150 mm x 30 mm, 5µm).
- **Columna monolítica: Chromolith Performance RP-18e** (100 mm x 4,6 mm).

Una vez desarrollados estos dos métodos de separación de capsaicinos se ha realizado una comparación entre ellos.

Estos dos métodos desarrollados se emplearán para el análisis y cuantificación de los capsaicinos presentes en los pimientos y en los extractos de los mismos.

IV. 1. 1. Desarrollo de un método de análisis de capsaicinoides en pimientos mediante el empleo de la cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa con una columna C-18 convencional.

Resumen.

En este apartado se ha llevado a cabo el desarrollo de un método de separación y cuantificación de capsaicinoides en pimientos mediante el empleo de la CLAE utilizando una **columna C-18** convencional.

Una vez desarrollado el gradiente a utilizar, se han estudiado distintos parámetros como el flujo de disolvente, la temperatura de la columna, la repetibilidad y reproducibilidad del método, así como la robustez del mismo realizando un estudio del volumen de inyección y del porcentaje de metanol en la muestra.

IV. 1. 1. 1. Introducción.

La cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) en fase inversa es una de las herramientas más eficaces para la separación y análisis de un gran número de compuestos naturales presentes en plantas, alimentos y formulaciones farmacéuticas. En particular, esta técnica es la más empleada a la hora de analizar los capsaicinoides presentes en pimientos y alimentos elaborados a partir de los mismos.^{233,234,235}

Debido a la importancia de estos compuestos se hace necesario elaborar métodos de análisis rápidos, eficaces y reproducibles de capsaicinoides. Existe un gran número de métodos de CLAE en fase inversa de separación de capsaicinoides, que utilizan distintos disolventes, distintos flujos y distintos gradientes de separación.^{236,237,238}

En este trabajo se intentará desarrollar un método de CLAE en fase inversa rápido, reproducible y robusto de separación y cuantificación de los 5 capsaicinoides mayoritarios (nordihidrocapsaicina, capsaicina, dihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina) presentes en los pimientos picantes. La elección de la fase inversa y de los disolventes se ha realizado en base a los trabajos encontrados en la bibliografía

²³³ O. Sticher, F. Soldat, R.K. Joshi. "High-performance liquid chromatographic separation and quantitative determination of capsaicin, dihydrocapsaicin, nordihydrocapsaicin and homodihydrocapsaicin in natural capsaicinoid mixtures and *Fructus capsicini*". *Journal of Chromatography A*, 166: 221-231, 1978.

²³⁴ N. Kozukue, J.S. Han, E. Kozukue, S.J. Lee, J.A. Kim, K.R. Lee, C.E. Levin, M. Friedman. "Analysis of eight capsaicinoids in peppers and pepper-containing foods by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 9172-9181, 2005.

²³⁵ K. Iwai, T. Suzuki, H. Fujiwake. "Simultaneous microdetermination of capsaicin and its four analogues by using high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*, 172: 303-311, 1979.

²³⁶ D.E. Games, N.J. Alcock. "Analysis of pepper and capsicum oleoresins by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry and field desorption mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*, 294: 269-279, 1984.

²³⁷ K.M. Weaver, R.G. Luker, M.E. Neale. "Rapid quality control procedure for the determination of Scoville heat units and the detection of chillies in black pepper, via high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*, 301: 288-291, 1984.

²³⁸ U. Schweiggert, R. Carle, A. Schieber. "Characterization of major and minor capsaicinoids and related compounds in chilli pods (*Capsicum frutescens* L.) by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry". *Analytica Chimica Acta*, 557: 236-244, 2006.

consultada^{239,240,241}. En la bibliografía se observa que las mezclas metanol/agua y las columnas C-18 son los medios más habituales. Una vez desarrollado el gradiente a utilizar, se han estudiado distintos parámetros como el flujo de disolvente, la temperatura de la columna, la repetibilidad y reproducibilidad del método, así como la robustez del mismo realizando un estudio del volumen de inyección y del porcentaje de metanol en la muestra.

IV. 1. 1. 2. Materiales y métodos.

Muestras.

Los extractos empleados para el desarrollo del método cromatográfico de separación de capsaicinoides han sido obtenidos a partir del pimiento picante cayena (*Capsicum frutescens*). Los pimientos fueron pelados separándoles el pedúnculo y las pepitas. Únicamente el pericarpio y la placenta del pimiento han sido estudiados. Tanto el pericarpio como la placenta han sido triturados con una batidora convencional, hasta que se obtuvo una muestra homogénea para el análisis. La muestra triturada obtenida se ha conservado en el congelador a -32 °C hasta su análisis.

Obtención de los extractos.

El extracto del pimiento picante cayena (*Capsicum frutescens*) fue obtenido mediante el empleo de la extracción asistida por ultrasonidos usando un método que se expondrá en el capítulo IV.2. para la extracción de capsaicinoides. Los extractos obtenidos han sido filtrados a través de un filtro de jeringa de nylon de 0,45 µm (Millex-HN, Ireland) antes de los análisis cromatográficos. Los extractos han sido empleados para la validación del método cromatográfico propuesto.

Cromatografía líquida de alta eficacia.

El desarrollo del método cromatográfico se ha realizado en el sistema cromatográfico Dionex. Para la separación y cuantificación de los capsaicinoides en los extractos, se han estudiado distintas condiciones de operación. Las condiciones de operación del cromatógrafo empleadas han sido las siguientes:

- **Fases móviles:**

Disolvente A (0,1 % v/v ácido acético en agua)

Disolvente B (0,1 % v/v ácido acético en metanol)

²³⁹ V.K. Attuquayefio, K.A. Buclé. "Rapid simple preparation method for HPLC análisis of capsaicinoids in capsicum fruits and oleoresins". Journal of Agricultural and Food Chemistry 35: 777-779, 1987.

²⁴⁰ T.H. Cooper, J.A. Guzinski, C. Fisher. "Improved high-performance liquid chromatography method for the determination of major capsaicinoids in capsicum oleoresins". Journal of Agricultural and Food Chemistry 39: 2253-2256, 1991.

²⁴¹ F. Korel, N. Bagdatlioglu, M.O. Balaban, Y. Hisil. "Ground red peppers: capsaicinoids content, Scoville scores, and discrimination by an electronic nose". Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 3257-3261, 2002.

- **Temperatura de la columna:** 15-40 °C
- **Volumen de inyección:** 10-40 µL.
- **Flujo de disolvente:** 0,6-0,8 mL/min.
- **Detección:** Espectrofotómetro de fluorescencia Dionex.

λ excitación: 280 nm

λ emisión: 310 nm

Ganancia: 16

Sensibilidad: Media

Respuesta: 0,5 segundos

- **Columna:** Phenomenex, Luna (150 mm x 30 mm, 5µm).

Identificación de los capsaicinoides.

La identificación de los capsaicinoides presentes en los extractos se ha realizado mediante cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (CL/EM) en el equipo Finnigan. La identificación en el equipo Dionex se ha llevado a cabo por comparación de los tiempos de retención y de los espectros UV-Vis de los picos presentes en los extractos de pimientos, así como los de los patrones de capsaicina y dihidrocapsaicina.

Los capsaicinoides que se han identificado en los extractos de pimientos analizados han sido: nordihidrocapsaicina (n-DHC), capsaicina (C), dihidrocapsaicina (DHC), homocapsaicina (h-C) y homodihidrocapsaicina (h-DHC).

Cuantificación de los capsaicinoides en el extracto.

La cuantificación de los capsaicinoides se ha llevado a cabo empleando las curvas de calibrado obtenidas por el análisis de los patrones de capsaicina y dihidrocapsaicina. Debido a la inexistencia de patrones de nordihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina, se ha empleado la curva de calibrado de la capsaicina para la cuantificación de la homocapsaicina y la curva de calibrado de la dihidrocapsaicina para la cuantificación de la nordihidrocapsaicina y de la homodihidrocapsaicina, debido a sus semejanzas estructurales.

Propiedades de la curva de calibrado.

Se han realizado curvas de calibrado con el método desarrollado para la capsaicina y la dihidrocapsaicina que son los dos patrones de capsaicinoides disponibles comercialmente. Los resultados obtenidos se representan en la tabla 9. Los límites de detección y de cuantificación han sido calculados usando el software ALAMIN.

	CAPSAICINA	DHC
Ecuación	$y = 786721 x + 3419,46$	$y = 801238 x - 187,92$
r²	0,9988	0,9989
LD (ppm)	0,009	0,008
LQ (ppm)	0,029	0,0028
Rango Lineal	0,001-0,2	0,001-0,2

Tabla 9: *Propiedades analíticas de la curva de calibrado de la capsaicina y de la dihidrocapsaicina.*

IV. 1. 1. 3. Resultados y discusión.

Selección de la composición de la fase móvil.

Los métodos que aparecen en la bibliografía para el análisis de capsaicinoides emplean indistintamente mezclas de agua con metanol o con acetonitrilo por lo general. De todas formas, el empleo de metanol en la fase móvil en sustitución del acetonitrilo tiene muchas ventajas. El metanol es un disolvente más barato y ambientalmente más compatible que el acetonitrilo, además de ser menos tóxico.

Estos aspectos son muy importantes, debido al continuado manejo que se tiene con estos disolventes y al gran volumen de desechos que se generan. Por lo tanto, el desarrollo del método cromatográfico se llevó a cabo empleando metanol.

Con relación a la cantidad de ácido en la muestra, la mayoría de los métodos emplean pequeñas cantidades para mejorar la separación. Sin embargo, la cantidad de ácido en la fase móvil afecta no solo a la separación sino también a la vida útil de la columna. Los ácidos más empleados son el ácido acético y el ácido fórmico en concentraciones que oscilan del 0,1 al 2 %. Finalmente se ha decidido utilizar el ácido acético a una concentración del 0,1 % debido a la disponibilidad de este disolvente en el laboratorio.

Por lo tanto, los disolventes empleados en el desarrollo del método son:

Disolvente A (0,1 % v/v ácido acético en agua)

Disolvente B (0,1 % v/v ácido acético en metanol)

Obtención del gradiente óptimo de separación.

Inicialmente se ha desarrollado un método de separación cromatográfico. Para la separación cromatográfica se ha utilizado un método en gradiente, trabajando a un flujo de 0,8 mL/min. El gradiente empleado fue el siguiente: 0 min., 0 % B; 2 min., 55 % B; 7 min., 55 % B; 9 min., 60 % B; 15 min., 60 % B; 18 min., 65 % B; 20 min., 65 % B; 25 min., 70 % B; 30 min., 70 % B; 32 min., 100 % B; 38 min., 100 % B. La temperatura de la columna se ha mantenido constante a 25 °C.

El cromatograma resultante aplicando dicho método de separación, en las condiciones anteriormente señaladas, para los 5 capsaicinoides presentes en el pimiento cayena, viene recogido en la figura 38.

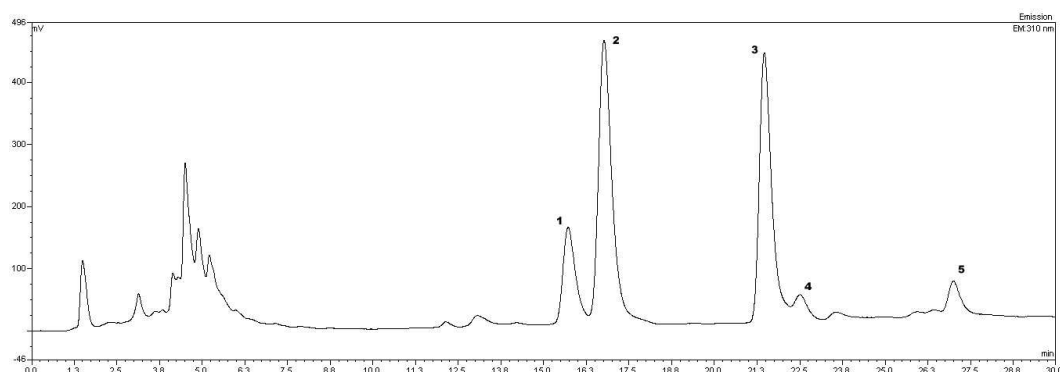


Figura 38: Cromatograma empleando una columna HPLC convencional C-18 (2) (Luna 5 μ , 150 x 3 mm, Phenomenex): 1 (*n*-DHC); 2 (*C*); 3 (*DHC*); 4 (*h*-*C*); 5 (*h*-*DHC*).

Efecto de la temperatura.

Un parámetro de operación importante en el desarrollo de un método cromatográfico es la temperatura, la cual puede mejorar tanto la resolución como la rapidez del análisis. Además de los efectos directos en la columna, la temperatura también aumenta la solubilidad de los analitos, disminuye reacciones con la fase estacionaria y disminuye la viscosidad (que afecta a la presión). Por lo tanto la temperatura puede ser una valiosa herramienta para la separación de los capsaicinoides.

En este apartado se ha evaluado el efecto de la temperatura de la columna en la resolución cromatográfica de los picos así como en el tiempo de separación de los mismos. Para ello, se ha llevado a cabo el estudio utilizando distintas temperaturas de columna (10, 20, 25, 30, 35 y 40 °C). El flujo de disolvente utilizado ha sido de 0,8 mL/min.

En la tabla 10 se representan las resoluciones de cada pico cromatográfico y los tiempos de separación correspondientes a cada uno de los capsaicinoides estudiados, a la temperatura ensayada.

Temp.	<i>n</i> - <i>DHC</i>		<i>C</i>		<i>DHC</i>		<i>h</i> - <i>C</i>		<i>h</i> - <i>DHC</i>	
	t.	Res.	t.	Res.	t.	Res.	t.	Res.	t.	Res.
15 °C	20,75	1,19	21,73	5,69	26,46	n.d.	27,46	n.d.	32,36	2,57
20 °C	17,16	1,54	18,35	5,98	22,9	n.d.	24	n.d.	28,3	8,16
25 °C	15,82	1,56	16,87	7,00	21,51	n.d.	22,54	n.d.	26,97	9,11
30 °C	14,78	1,57	15,68	8,07	20,38	n.d.	21,3	n.d.	25,76	9,64
35 °C	14	1,59	14,83	8,16	19,36	n.d.	20,31	n.d.	24,63	9,74
40 °C	13,33	1,57	14,1	7,59	18,28	n.d.	19,3	n.d.	23,48	10,17

Tabla 10: Resolución media ($n=3$) y tiempos medios ($n=3$) de los picos cromatográficos correspondientes a los capsaicinoides estudiados a cada temperatura. n.d. (no disponibles, picos parcialmente solapados).

A la vista de la tabla 10 se observa que a medida que aumentamos la temperatura de la columna, los capsaicinoides quedan menos retenidos saliendo antes de la columna de separación. Como ejemplo, la homocapsaicina tiene un tiempo de retención de 32,36 minutos a la temperatura de 10 °C, acortándose dicho tiempo a 23,48 minutos si la temperatura de la columna sube a 40 °C.

Otro aspecto importante a estudiar es la evolución en la resolución de los picos cromatográficos al aumentar la temperatura. Al ir aumentando la temperatura se produce un incremento en la resolución de los picos hasta la temperatura de 35 °C. Ya a 40 °C, la resolución de la nordihidrocapsaicina y de la capsaicina empieza a disminuir. Por todo ello, se considera que la temperatura óptima de trabajo con esta columna para la separación de los capsaicinoides presentes en los extractos de pimientos es de 35 °C.

Cabe reseñar que no se han conseguido separar con una buena resolución cromatográfica la dihidrocapsaicina de la homocapsaicina.

Efecto del flujo en la separación cromatográfica.

Para este estudio se han empleado flujos de 0,6, 0,65, 0,7, 0,75 y 0,8 mL/min. La temperatura de la columna se ha mantenido constante a 35 °C.

En la tabla 11 se representan las resoluciones y los tiempos de retención de los picos cromatográficos correspondientes a los capsaicinoides estudiados a los diferentes flujos ensayados.

Flujo (mL/min)	<i>n-DHC</i>		<i>C</i>		<i>DHC</i>		<i>h-C</i>		<i>h-DHC</i>	
	t.	Res.	t.	Res.	t.	Res.	t.	Res.	t.	Res.
0,6	16,98	1,55	18,01	6,86	22,47	n.d.	23,46	n.d.	27,84	9,38
0,65	16,03	1,56	16,99	7,48	21,54	n.d.	22,47	n.d.	26,90	10,08
0,7	15,23	1,55	16,12	7,98	20,73	n.d.	21,63	n.d.	26,04	10,17
0,75	14,56	1,55	15,40	8,27	20,00	n.d.	20,91	n.d.	25,27	10,19
0,8	13,97	1,56	14,77	8,39	19,33	n.d.	20,28	n.d.	24,58	10,21

Tabla 11: Tiempo de retención en minutos ($n=3$) y resolución ($n=3$) de los picos cromatográficos correspondientes a los capsaicinoides estudiados a cada flujo de disolvente ensayado. n.d. (no disponible, picos parcialmente solapados).

Se observa, como cabe esperar, que al aumentar el flujo de disolvente, los capsaicinoides se eluyen antes de la columna. Por ejemplo, la homodihidrocapsaicina que sale a un tiempo de retención de 27,84 minutos si se emplea un flujo de 0,6 mL/min., tiene un tiempo de retención de 24,58 minutos a un flujo de 0,8 mL/min.

Respecto a la resolución, se observa que por lo general, ésta va aumentando a medida que aumentamos el flujo hasta llegar a un flujo de 0,8 mL/min. No se han ensayado flujos superiores debido a la presión que se alcanza en la columna con este flujo de disolvente, cercano a la presión máxima recomendada para la columna.

Por lo tanto, el flujo óptimo de separación de los capsaicinoides será de 0,8 mL/min. en estas condiciones de separación.

Repetibilidad y reproducibilidad del método.

Se ha estudiado la repetibilidad y la reproducibilidad del método desarrollado para el área de pico de cada capsaicinoide, para la resolución cromatográfica y para el factor de capacidad de los mismos. Para ello se han realizado un total de 24 análisis de la misma muestra (extracto del pimiento picante cayena) repartidas de la siguiente manera: 12 análisis realizados el primer día del estudio y 6 análisis más en cada uno de los dos días consecutivos.

Se ha utilizado el método en gradiente, optimizado a un flujo de disolvente de 0,8 mL/min. y a una temperatura de columna de 35 °C.

Los resultados obtenidos expresados en desviación estándar relativa de la repetibilidad y de la reproducibilidad respecto al área de pico, a la resolución cromatográfica de los picos y respecto al factor de capacidad de los capsaicinoides, se presentan en la tabla 12.

		<i>n-DHC</i>	<i>C</i>	<i>DHC</i>	<i>h-C</i>	<i>h-DHC</i>
DER (%) repetib.	Área	1,98	2,31	2,23	3,40	2,05
	Res.	0,41	0,27	n.d.	n.d.	0,35
	k	0,11	0,11	0,10	0,08	0,07
DER (%) reprod.	Área	2,59	2,80	2,71	3,92	2,96
	Res.	1,22	1,02	n.d.	n.d.	0,85
	k	0,15	0,17	0,15	0,14	0,14

Tabla 12: Repetibilidad ($n=12$) y reproducibilidad ($n=18$) del método desarrollado para los capsaicinoides analizados respecto al área de pico, a la resolución y al factor de capacidad.

Se observa que el método desarrollado es muy repetitivo y reproducible con respecto a los factores de capacidad, teniendo todos los capsaicinoides una DER inferior al 0,17 %. Con respecto a las resoluciones cromatográficas, dicho método también es altamente repetitivo y reproducible, ya que su DER máxima es tan solo del 1,22 % para la nordihidrocapsaicina.

La menor repetibilidad y reproducibilidad la presenta con respecto al área de los picos, aunque también se obtienen valores de DER máxima muy pequeños, estando todos por debajo del 4 %.

Propiedades analíticas del método.

Las propiedades analíticas del método desarrollado se presentan en la tabla 13.

	<i>n-DHC</i>	<i>C</i>	<i>DHC</i>	<i>h-C</i>	<i>h-DHC</i>
T. Ret. (min.)	14,03	14,84	19,42	20,35	24,67
k	11,21	11,91	15,89	16,71	20,47
Resolución	1,56	8,47	n.d.	n.d.	9,67
Anchura (min.)	0,50	0,53	0,57	0,69	0,57
Asimetría	1,43	1,46	1,29	1,27	1,35

Tabla 13: Propiedades analíticas ($n=3$) del método en gradiente desarrollado, a un flujo de 0,8 mL/min. y a una temperatura de columna de 35 °C. n.d. (no disponible, picos parcialmente solapados).

IV. 1. 1. 4. Robustez del método.

En este apartado se estudiará la robustez del método respecto al volumen de inyección empleado y respecto al porcentaje de metanol en la muestra.

Volumen de inyección.

Para determinar la robustez del método frente al volumen de inyección se han realizado análisis empleando distintos volúmenes de inyección (10, 20, 25, 30 y 40 μ L), usando un extracto del pimiento picante cayena. Se comprobó el efecto de esta variable en los parámetros factor de capacidad de los picos cromatográficos, en las resoluciones cromatográficas de los picos y en las áreas de los picos cromatográficos. Cada ensayo se ha llevado a cabo por triplicado.

En la tabla 14 se muestran los valores medios de los factores de capacidad (k) de los capsaicinoides estudiados al variar el volumen de inyección entre 10 y 40 μ L. Se ha realizado un análisis de la varianza de un factor de estos resultados, no encontrándose diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores para cada uno de los capsaicinoides estudiados.

Volumen	<i>n-DHC</i>	<i>C</i>	<i>DHC</i>	<i>h-C</i>	<i>h-DHC</i>
10 μl	11,197	11,898	15,875	16,701	20,449
20 μl	11,188	11,884	15,858	16,678	20,420
25 μl	11,177	11,872	15,838	16,661	20,406
30 μl	11,191	11,890	15,867	16,684	20,432
40 μl	11,188	11,881	15,855	16,678	20,423

Tabla 14: Valores medios ($n=3$) de los factores de capacidad (k) de los capsaicinoides estudiados al modificar los volúmenes de inyección (10-40 μL).

Puede concluirse que los factores de capacidad no están influenciados al variar el volumen de inyección en el intervalo comprendido entre 10 y 40 μL .

Respecto a la influencia del área de los picos al modificar los volúmenes de inyección (10-40 μL), se han realizado curvas de regresión para cada uno de los capsaicinoides estudiados, para comprobar de esta manera la linealidad de las curvas. Los resultados obtenidos vienen recogidos en la tabla 15.

Capsaicinoide	<i>n-DHC</i>	<i>C</i>	<i>DHC</i>	<i>h-C</i>	<i>h-DHC</i>
r^2	0,9972	0,9974	0,9982	0,9962	0,9961
DER b (%)	3,03	2,92	2,44	3,59	3,62

Tabla 15: Valores de r^2 y de las DER de la pendiente (%) de las curvas de regresión de los capsaicinoides estudiados al modificar los volúmenes de inyección (10-40 μL).

Puede comprobarse una buena linealidad de las curvas de calibrado al modificar los volúmenes de inyección. Por tanto, en lo que respecta a las áreas de los picos cromatográficos, se trata de un método robusto frente a variaciones en los volúmenes de inyección.

Con respecto a la influencia en la resolución al modificar los volúmenes de inyección, se ha realizado un análisis de la varianza de un factor. Los datos obtenidos vienen recogidos en la tabla 16.

Volumen	<i>n-DHC</i>	<i>C</i>	<i>DHC</i>	<i>h-C</i>	<i>h-DHC</i>
10 μl	1,560 ^a	8,480 ^a	n.d.	n.d.	8,920 ^b
20 μl	1,563 ^a	8,407 ^a	n.d.	n.d.	9,327 ^a
25 μl	1,556 ^a	8,367 ^a	n.d.	n.d.	9,357 ^a
30 μl	1,556 ^a	8,387 ^a	n.d.	n.d.	9,367 ^a
40 μl	1,563 ^a	8,407 ^a	n.d.	n.d.	9,400 ^a

Tabla 16: Valores medios ($n=3$) de la resolución de los capsaicinoides estudiados al modificar los volúmenes de inyección (10-40 μL). Valores con distinta letra en superíndice (a-b) en la misma columna son significativamente distintos ($P < 0,05$). n.d. (no disponible, picos parcialmente solapados).

Se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas con respecto a la resolución de los picos cromatográficos con volúmenes de inyección comprendidos entre 10 y 40 μL salvo para la homocapsaicina al inyectarse un volumen de inyección de 10 μL .

A la vista de todos estos resultados obtenidos, se observa que el método desarrollado presenta una elevada robustez frente al volumen de inyección, si se considera el factor de capacidad de los capsaicinoides, el área de los picos y la resolución de los mismos.

Disolvente de la muestra.

Al trabajar con muestras cuyo contenido en agua es muy elevado, los métodos de extracción que se emplean, proporcionan extractos con diferentes proporciones de disolvente orgánico en agua. La presencia del disolvente orgánico puede provocar distorsiones en los picos cromatográficos, por lo que se hace necesario evaluar el efecto del disolvente de la muestra en los picos cromatográficos obtenidos. Para ello, se emplearon una serie de extractos con distintos porcentajes de metanol (25, 50, 75 y 100 %) en agua. Se ha estudiado el efecto del porcentaje de metanol en el área de los picos, en el factor de capacidad y en la resolución cromatográfica de los mismos. Para ello se ha llevado a cabo un análisis de la varianza de un factor para cada uno de los parámetros que se pretenden estudiar. El volumen de extracto inyectado ha sido de 20 μ l. Los análisis se han llevado a cabo por triplicado.

En la tabla 17 se presentan los resultados obtenidos.

% MeOH	<i>n</i> -DHC	<i>C</i>	<i>DHC</i>	<i>h</i> - <i>C</i>	<i>h</i> - <i>DHC</i>
100	11,212 ^a	11,907 ^a	15,892 ^a	16,710 ^a	20,472 ^a
75	11,200 ^a	11,904 ^a	15,881 ^a	16,695 ^{a,b}	20,455 ^a
50	11,182 ^b	11,878 ^b	15,861 ^b	16,681 ^b	20,429 ^b
25	11,159 ^c	11,855 ^c	15,820 ^c	16,657 ^c	20,391 ^c

Tabla 17: Valores medios ($n=3$) de los factores de capacidad (k) de los capsaicinoides estudiados al modificar el porcentaje de metanol en la muestra (25-100 %). Valores con distinta letra en superíndice (a-b-c) en la misma columna son significativamente distintos ($P < 0,05$).

Se observa que hay diferencias significativas en los factores de capacidad al modificar el porcentaje de metanol en la muestra (25-100 %). No se observan diferencias significativas entre los porcentajes del 100 y del 75 %, pero si entre estos con respecto al 50 % y 25 % de metanol respectivamente. Por lo tanto cabe concluir que dicho método desarrollado es poco robusto para los factores de capacidad al modificar el porcentaje de metanol en la muestra.

Respecto a la robustez en el área al modificar el porcentaje de metanol en la muestra, se ha realizado el análisis de la varianza de un factor. Los datos vienen recogidos en la tabla 18.

% MeOH	<i>n</i> -DHC	<i>C</i>	<i>DHC</i>	<i>h</i> - <i>C</i>	<i>h</i> - <i>DHC</i>
100	70874 ^{a,c}	278676 ^a	225398 ^a	24581 ^a	22197 ^a
75	67535 ^b	264789 ^b	205956 ^b	22428 ^a	20197 ^b
50	68707 ^{b,c}	265770 ^b	213836 ^b	23152 ^a	20886 ^b
25	72341 ^a	284388 ^a	229324 ^a	23293 ^a	22574 ^a

Tabla 18: Valores medios ($n=3$) de las áreas correspondientes a los capsaicinoides estudiados para los distintos porcentajes de metanol (25-100 %) en los extractos. Valores con distinta letra en superíndice (a-b-c) en la misma columna son significativamente distintos ($P < 0,05$).

Existen diferencias significativas en las áreas de los picos al modificar el porcentaje de metanol en la muestra. Se observa por lo general, muestras con 25 y 100 % de porcentaje de metanol son similares entre sí, y muestras con 50 y 75 % de porcentaje en metanol también son similares entre sí, pero significativamente diferentes a las anteriores, salvo para la homocapsaicina, capsaicinoide para el cual no hay diferencias en el área al variar el porcentaje de metanol de la muestra.

Con respecto a la influencia en la resolución al modificar el porcentaje de metanol en la muestra, también se ha realizado un análisis de la varianza de un factor. Los datos obtenidos vienen recogidos en la tabla 19.

% MeOH	<i>n</i> -DHC	<i>C</i>	<i>DHC</i>	<i>h</i> - <i>C</i>	<i>h</i> - <i>DHC</i>
100	1,550 ^a	8,300 ^a	n.d.	n.d.	9,467 ^a
75	1,567 ^a	8,313 ^a	n.d.	n.d.	9,447 ^a
50	1,543 ^a	8,303 ^a	n.d.	n.d.	9,483 ^a
25	1,520 ^b	8,253 ^a	n.d.	n.d.	9,227 ^b

Tabla 19: Valores medios ($n=3$) de la resolución de los capsaicinoides estudiados al modificar los porcentajes de metanol (25-100 %) en los extractos. Valores con distinta letra en superíndice (a-b) en la misma columna son significativamente distintos ($P < 0,05$). n.d. (no disponible, picos parcialmente solapados).

Se observa en la tabla 19 que no se aprecian diferencias significativas en la resolución cromatográfica de los picos al modificar el porcentaje de metanol en valores comprendidos entre 100 y 50 % de metanol. A 25 % de metanol, las diferencias son significativas tanto para la nordihidrocapsaicina como para la homodihidrocapsaicina, pero presentándose dicho método como robusto frente a la resolución cromatográfica de los picos.

A la vista de todos estos resultados obtenidos, vemos que el método desarrollado no presenta una elevada robustez frente al porcentaje de metanol en la muestra, si consideramos el factor de capacidad de los capsaicinoides, el área de los picos y la resolución de los mismos. Por lo tanto para emplear el método desarrollado será necesario

tener la precaución de ajustar los valores de los porcentajes de metanol en la muestra a un valor común a todas ellas.

IV. 1. 1. 5. Conclusiones.

En este apartado se ha desarrollado un método de separación de los 5 capsaicinoides mayoritarios en pimientos (nordihidrocapsaicina, capsaicina, dihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina) mediante el empleo de una columna C-18 convencional, Phenomenex, Luna (150 mm x 30 mm, 5 μ m).

El método desarrollado consiste en un gradiente de separación, que utiliza 2 disolventes: agua acidificada (0,1 % ácido acético, disolvente A) y metanol acidificado (0,1 % ácido acético, disolvente B). El método emplea un flujo de 0,8 mL/min. y una temperatura de columna de 35 °C. Este método separa estos 5 capsaicinoides en un tiempo inferior de 25 minutos.

La repetibilidad y reproducibilidad del método son muy elevadas sobre todo con respecto a los factores de capacidad y a las resoluciones cromatográficas de los picos. La robustez del método es muy elevada con respecto a los volúmenes de inyección (10-40 μ l), pero baja con respecto al porcentaje de metanol en la muestra (25-100 %).

Para emplear el método desarrollado será necesario tener la precaución de ajustar los valores de los porcentajes de metanol en la muestra a un valor común para todas ellas.

IV. 1. 2. Desarrollo de un método de análisis de capsaicinoides en pimientos mediante el empleo de la cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa con una columna monolítica.

Resumen.

El análisis por cromatografía líquida de alta eficacia de capsaicinoides en pimientos es un área que se ha desarrollado mucho en los últimos años. El desarrollo de nuevos rellenos en las columnas ha permitido un avance en este campo, consiguiéndose separaciones más rápidas y selectivas de compuestos naturales²⁴². Entre estos rellenos se encuentran los de sílice-monolítica²⁴³. Por ello, en este apartado se desarrolla un método para la determinación de capsaicinoides por cromatografía líquida de alta eficacia empleando columnas monolíticas.

En este apartado se ha llevado a cabo el desarrollo de un método de separación y cuantificación de capsaicinoides (nordihidrocapsaicina, capsaicina, dihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina) en pimientos mediante el empleo de una columna monolítica **Chromolith Performance RP-18e** (100 mm x 4,6 mm).

Al igual que en el apartado anterior, una vez desarrollado el gradiente a utilizar, se han estudiado distintos parámetros como el flujo de disolvente, la temperatura de la columna, la repetibilidad y reproducibilidad del método, así como la robustez del mismo realizando un estudio del volumen de inyección y de porcentajes de metanol en la muestra.

IV. 1. 2. 1. Introducción.

La rapidez y la economía en los análisis está tomando una importancia creciente en muchas aplicaciones cromatográficas, incluyendo análisis farmacéuticos y análisis de alimentos, con el fin de aumentar el número de análisis a realizar en el mismo tiempo, reduciendo costes.^{244,245}

En los últimos años han sido introducidas en el mercado un tipo especial de columnas de gran velocidad, en base sílice, denominadas columnas monolíticas²⁴⁶. El uso de estas fases monolíticas estacionarias se está extendiendo para reducir los tiempos de retención de los análisis.

²⁴² L. Novakova, L. Matysova, D. Solichova, M.A. Koupparis, P. Solich. "Comparison of performance of C18 particle-packed columns in liquid chromatographic determination of estrogen and ketoprofen gel". *Journal of Chromatography B*, 813: 191-197, 2004.

²⁴³ T. Ikegami, N. Tanaka. "Monolithic columns for high-efficiency HPLC separations". *Current opinion in Chemical Biology*, 8: 527-533, 2004.

²⁴⁴ H.Y. aboul-Enein, I. Ali. "Determination of tadalafil in pharmaceutical preparation by HPLC using monolithic silica column". *Talanta*, 65: 276-280, 2005.

²⁴⁵ N. Wu, J. Dempsey, P.M. Yehl, A. Dovletoglou, D. Ellison, J. Wyratt. "Practical aspects of fast HPLC separations for pharmaceutical process development using monolithic columns". *Analytica Chimica Acta*, 523: 149-156, 2004.

²⁴⁶ N. Tanaka, H. Kobayashi, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, K. Hosoya, T. Ikegami. "Monolithic silica columns for high-efficiency chromatographic separations". *Journal of Chromatography A*, 965: 35-49, 2002.

Han sido publicadas algunas revisiones exponiendo la rapidez y la economía de los análisis usando este tipo de columnas, con una gran variedad de compuestos^{247,248,249}. Sin embargo no se han realizado hasta el momento estudios de separación de capsaicinoides con este tipo de columnas.

En este apartado se intentará desarrollar un método de CLAE en fase inversa rápido, reproducible y robusto de separación y cuantificación de los 5 capsaicinoides mayoritarios (nordihidrocapsaicina, capsaicina, dihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina) presentes en los pimientos picantes mediante el empleo de este tipo de columnas.

IV. 1. 2. 2. Materiales y métodos.

Muestras.

Los extractos empleados para el desarrollo del método cromatográfico de separación de capsaicinoides mediante el empleo de columnas monolíticas han sido similares a los empleados en el apartado IV. 1. 1.

Cromatografía líquida de alta eficacia.

El desarrollo del método cromatográfico se ha realizado en el sistema cromatográfico Dionex. Para la separación y cuantificación de los capsaicinoides en los extractos, se han estudiado distintas condiciones de operación. Las condiciones de operación del cromatógrafo empleadas han sido las siguientes:

- **Fases móviles:**

Disolvente A (0,1 % v/v ácido acético en agua)

Disolvente B (0,1 % v/v ácido acético en metanol)

- **Temperatura de la columna:** 10-40 °C
- **Volumen de inyección:** 10-50 µL.
- **Flujos de disolvente:** 4-7 mL/min.
- **Detección:** Espectrofotómetro de fluorescencia Dionex.

λ excitación: 280 nm

λ emisión: 310 nm

Ganancia: 16

Sensibilidad: Media

Respuesta: 0,5 segundos

²⁴⁷ M. Castellari, E. Sartini, A. Fabiani, G. Arfelli, A. Amati. "Analysis of wine phenolics by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column". Journal of Chromatography A, 973: 221-227, 2002.

²⁴⁸ J. Pol, T. Hyotylainen, O. Ranta-Aho, M.L. Riekkola. "Determination of Lycopene in food by on-line SFE coupled to HPLC using a single monolithic column for trapping and separation". Journal of Chromatography A, 1052: 25-31, 2004.

²⁴⁹ M.A. Rostagno, M. Palma, C.G. Barroso. "Fast analysis of soy isoflavones by high-performance liquid chromatography with monolithic columns". Analytica Chimica Acta, 582: 243-249, 2007.

- **Columna: Chromolith Performance RP-18e** (100 mm x 4,6 mm)

Identificación de los capsaicinoides.

La identificación de los capsaicinoides presentes en los extractos se ha realizado mediante cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (CL/EM) en el equipo Finnigan. La identificación en el equipo Dionex se ha llevado a cabo por comparación de los tiempos de retención y de los espectros UV-Vis de los picos presentes en los extractos de pimientos, así como los de los patrones de capsaicina y dihidrocapsaicina.

Los capsaicinoides que se han identificado en los extractos de pimientos analizados han sido: nordihidrocapsaicina (n-DHC), capsaicina (C), dihidrocapsaicina (DHC), homocapsaicina (h-C) y homodihidrocapsaicina (h-DHC).

Cuantificación de los capsaicinoides en el extracto.

La cuantificación de los capsaicinoides se ha llevado a cabo empleando las curvas de calibrado obtenidas por el análisis de los patrones de capsaicina y dihidrocapsaicina. Debido a la inexistencia de patrones de nordihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina, para la cuantificación de la homocapsaicina se ha empleado la curva de calibrado de la capsaicina mientras que la curva de calibrado de la dihidrocapsaicina se ha empleado para la cuantificación de la nordihidrocapsaicina y de la homodihidrocapsaicina, debido a sus semejanzas estructurales.

Propiedades de la curva de calibrado.

Se han realizado curvas de calibrado con el método desarrollado para la capsaicina y la dihidrocapsaicina que son los dos patrones de capsaicinoides disponibles comercialmente. Los resultados obtenidos se representan en la tabla 20. Los límites de detección y de cuantificación han sido calculados usando el software ALAMIN.

	CAPSAICINA	DHC
Ecuación	$y = 112901 x + 187,38$	$y = 151770 x + 4589,35$
r²	0,9996	0,9995
LD (ppm)	0,008	0,011
LQ (ppm)	0,028	0,036
Rango Lineal	0,005-0,5	0,005-0,5

Tabla 20: *Propiedades analíticas de la curva de calibrado de la capsaicina y de la dihidrocapsaicina.*

IV. 1. 2. 3. Resultados y discusión.

Selección de la composición de la fase móvil.

Al igual que en el apartado anterior se usan disolventes con mezclas metanol/agua acidificadas con ácido acético. En este caso es aún de mayor importancia el empleo del metanol en lugar del acetonitrilo debido al alto flujo empleado con estas columnas. El metanol es un disolvente más barato y ambientalmente más compatible que el acetonitrilo, además de ser menos tóxico.

Por lo tanto, los disolventes empleados en el desarrollo del método son los mismos que se utilizaron en el desarrollo del método con la columna C-18 convencional:

Disolvente A (0,1 % v/v ácido acético en agua)

Disolvente B (0,1 % v/v ácido acético en metanol)

Métodos isocráticos.

No se tenían referencias para ser utilizadas como punto de partida en la optimización del método mediante el empleo de columnas monolíticas, así que la primera etapa en el desarrollo del método de análisis consistió en la selección de las condiciones isocráticas que proporcionarían la mejor separación de los capsaicinoides. Inicialmente se han estudiado distintos métodos en isocrático para la separación de los capsaicinoides mayoritarios presentes en los pimientos. Los métodos en isocrático desarrollados han sido 5: **método 1** (60 % disolvente A, 40 % disolvente B); **método 2** (55 % disolvente A, 45 % disolvente B); **método 3** (50 % disolvente A, 50 % disolvente B); **método 4** (45 % disolvente A, 55 % disolvente B); **método 5** (40 % disolvente A, 60 % disolvente B). Se ha fijado un máximo de 30 minutos para los análisis, con el fin de desarrollar un método rápido. El flujo empleado en los métodos en isocrático ha sido de 6 mL/min. La temperatura en la columna se ha mantenido constante a 30 °C.

Método	<i>n</i> -DHC	<i>C</i>	<i>DHC</i>	<i>h</i> - <i>C</i>	<i>h</i> - <i>DHC</i>
1 (40 % B)	7,6	8,9	17,7	20,8	> 30
2 (45 % B)	4,2	4,8	9,0	10,4	19,2
3 (50 % B)	2,4	2,7	4,8	5,5	9,7
4 (55 % B)	1,5	1,6	2,6	2,9	4,9
5 (60 % B)	1,0	1,0	1,4	1,4	2,5

Tabla 21: *Tiempos de retención medios en minutos (n=3) de los distintos capsaicinoides empleando métodos de separación en isocrático.*

En la tabla 21 se observa que la separación obtenida entre los compuestos analizados fue aceptable empleando el método 3 (50 % disolvente A, 50 % disolvente B). Los métodos con mayor poder de elución no permitían resolver los picos iniciales (métodos 4 y 5) mientras que los métodos con menor poder de elución implicaron tiempos de análisis

notoriamente más largos (20 minutos para el método 2 y más de 30 minutos para el método 1).

Por tanto, a la vista de los cromatogramas, el método en isocrático más adecuado a la hora de separar capsaicinoides es el método 3 (50 % disolvente A, 50 % disolvente B) en el que se llega a un equilibrio entre la resolución cromatográfica entre los picos y el tiempo de análisis, obteniendo el último capsaicinoide estudiado (*h*-DHC) en el minuto 9,7. Este método en isocrático nos servirá de punto de partida para el desarrollo de un método en gradiente que permita reducir aún más el tiempo del análisis.

Obtención del gradiente óptimo de separación.

Una vez realizado el estudio del método en isocrático más apropiado a la hora de separar los capsaicinoides, empleando los mismos disolventes y trabajando a un flujo de 6 mL/min., se ha desarrollado un método de separación de capsaicinoides en gradiente: 0 min., 10% B; 2 min., 50 % B; 4 min., 50 % B; 4.5 min., 55 % B; 5.5 min., 55 % B; 6 min., 60 % B; 7 min., 60 % B; 9 min., 70 % B; 10 min., 100 % B; 15 min., 100 % B. La temperatura se ha mantenido constante a 30 °C.

Empleando este método en gradiente, se ha obtenido una buena separación de los capsaicinoides estudiados con una aceptable resolución de los picos cromatográficos, y acortando notablemente el tiempo de análisis si lo comparamos con el tiempo de análisis al utilizar columnas de CLAE convencionales de fase inversa C-18 como se desarrolla en el apartado IV.1.1.

El cromatograma resultante aplicando dicho método de separación, en las condiciones anteriormente señaladas, para los 5 capsaicinoides presentes en el pimiento picante cayena, viene recogido en la figura 39.

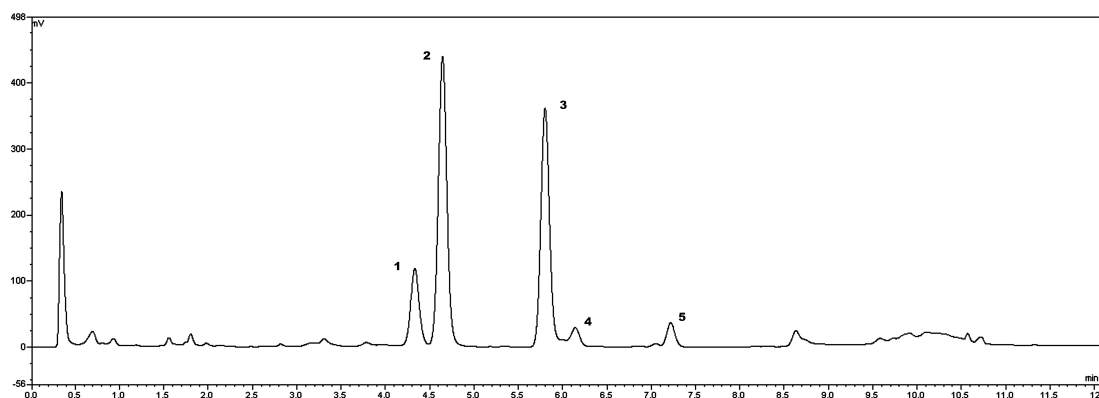


Figura 39: Cromatograma resultante empleando el gradiente desarrollado sobre una columna monolítica: 1 (*n*-DHC); 2 (*C*); 3 (*DHC*); 4 (*h*-*C*); 5 (*h*-*DHC*).

Efecto de la temperatura.

Se ha evaluado el efecto de la temperatura de la columna en la resolución cromatográfica de los picos. Para ello se ha llevado a cabo el estudio utilizando distintas temperaturas de columna (15, 25, 30, 35 y 40 °C).

En la tabla 22 se representan las resoluciones de cada pico cromatográfico correspondiente a cada uno de los capsaicinoides estudiados, a la temperatura ensayada.

Temperatura	<i>n-DHC</i>	<i>C</i>	<i>DHC</i>	<i>h-C</i>	<i>h-DHC</i>
15 °C	n.d.	3,66	n.d.	n.d.	3,29
25 °C	1,37	7,32	n.d.	n.d.	4,99
30 °C	1,57	8,24	1,55	6,85	7,71
35 °C	1,38	6,08	1,24	5,15	5,89
40 °C	1,1	4,71	n.d.	n.d.	3,98

Tabla 22: Resolución media ($n=3$) de los picos cromatográficos correspondientes a los capsaicinoides estudiados a cada temperatura. n.d. (no disponible, picos parcialmente solapados).

Se observa que es posible lograr la separación de los capsaicinoides a temperaturas comprendidas entre 30 y 35 °C. A 35 °C el tiempo de retención del último pico eluido fue de (7,12 min.), mientras que a 30 °C fue de (7,22 min.). En cualquier caso, se eligió la temperatura de 30 °C, al ser a esta temperatura mayores los valores de resolución cromatográfica. Se observa que al aumentar y disminuir esta temperatura, la resolución cromatográfica de los picos disminuye considerablemente, llegando incluso a la temperatura de 15 °C a no separarse la dihidrocapsaicina de la homocapsaicina, compuestos que a la temperatura de 30 °C se encuentran perfectamente separados.

Efecto del flujo en la separación cromatográfica.

Para este estudio se han empleado flujos de 4, 5, 5,5, 6, 6,5 y 7 mL/min. La temperatura de operación se ha mantenido constante a 30 °C.

En la tabla 23 se representan las resoluciones y los tiempos de retención de los picos cromatográficos correspondientes a los capsaicinoides estudiados a los diferentes flujos ensayados.

Flujo (mL/min.)	<i>n</i> -DHC		<i>C</i>		<i>DHC</i>		<i>h</i> - <i>C</i>		<i>h</i> - <i>DHC</i>	
	t.	Res.	t.	Res.	t.	Res.	t.	Res.	t.	Res.
4	5,6	1,62	5,88	7,19	7,12	1,58	7,41	6,54	8,67	5,63
5	4,93	1,58	5,17	8,3	6,42	1,55	6,69	6,88	7,93	7,82
5,5	4,6	1,68	4,88	7,09	6,1	1,72	6,42	6,31	7,58	7,69
6	4,29	1,76	4,61	6,59	5,78	1,86	6,12	5,91	7,22	8,27
6,5	4,17	1,68	4,45	6,27	5,5	1,69	5,8	5,84	6,86	8,11
7	3,74	1,47	3,94	7,58	4,95	n.d.	5,14	n.d.	6,2	6,14

Tabla 23: Tiempo de retención en minutos ($n=3$) y resolución ($n=3$) de los picos cromatográficos correspondientes a los capsaicinoides estudiados a cada flujo de disolvente ensayado. n.d. (no disponible, picos parcialmente solapados).

Se observa que se consiguen buenas resoluciones cromatográficas con flujos de disolventes comprendidos entre 4 y 6 mL/min. A partir de 6,5 mL/min., las resoluciones cromatográficas comienzan a disminuir, llegando incluso a 7 mL/min. a no encontrarse cromatográficamente resueltos la dihidrocapsaicina de la homocapsaicina.

Por el contrario, los flujos más altos, producen acortamientos significativos de los tiempos de análisis, llegando incluso a 7 mL/min. a tener los capsaicinoides eluidos en 6,2 minutos, pero esto a costa de un empeoramiento de la resolución del cromatograma. Por lo tanto hay que llegar a un acuerdo entre la resolución de los picos en el cromatograma y el tiempo de análisis, concluyendo que el flujo óptimo de separación para los 5 capsaicinoides mayoritarios presentes en los pimientos picantes es de 6 mL/min., flujo al cual tenemos una óptima resolución en la separación cromatográfica de los picos, y tenemos un tiempo de análisis muy reducido (7,22 minutos).

Repetibilidad y reproducibilidad del método.

Se ha estudiado la repetibilidad y la reproducibilidad del método desarrollado para el área de pico de cada capsaicinoide, para la resolución cromatográfica y para el factor de capacidad de los mismos. Para ello se han realizado un total de 24 análisis de la misma muestra (extracto del pimiento picante cayena) repartidas de la siguiente manera: 12 análisis realizados el primer día del estudio y seis análisis más en cada uno de los dos días consecutivos.

Se ha utilizado el método en gradiente optimizado a un flujo de disolvente de 6 mL/min. y a una temperatura de columna de 30 °C.

Los resultados obtenidos expresados en desviación estándar relativa de la repetibilidad y de la reproducibilidad respecto al área de pico, a la resolución cromatográfica de los picos y respecto al factor de capacidad de los capsaicinoides, se presentan en la tabla 24.

		<i>n-DHC</i>	<i>C</i>	<i>DHC</i>	<i>h-C</i>	<i>h-DHC</i>
DER (%) repetib.	Área	0,52	0,68	0,45	1,17	0,81
	Res.	1,58	0,65	1,36	1,72	1,44
	k	0,45	0,53	0,34	0,34	0,28
DER (%) reprod.	Área	1,74	1,73	1,6	1,81	1,6
	Res.	1,98	1,38	1,77	1,8	1,44
	k	0,91	0,92	0,69	0,63	0,47

Tabla 24: Repetibilidad ($n=12$) y reproducibilidad ($n=18$) del método desarrollado para los capsaicinoides analizados respecto al área de pico, a la resolución y al factor de capacidad.

Puede comprobarse que en todos los casos, las DER están por debajo del 2 %, tanto para el área, como para la resolución y para el factor de capacidad, por lo que se tiene un método con alta reproducibilidad en los resultados.

Propiedades analíticas del método.

Las propiedades analíticas del método desarrollado, a un flujo de 6 mL/min. y a una temperatura de columna de 30 °C, se presentan en la tabla 25.

	<i>n-DHC</i>	<i>C</i>	<i>DHC</i>	<i>h-C</i>	<i>h-DHC</i>
T. Ret. (min.)	4,31	4,63	5,80	6,15	7,22
k	11,69	12,61	16,07	17,08	20,24
Resolución	1,77	6,62	1,86	5,90	8,16
Anchura (min.)	0,18	0,18	0,18	0,19	0,17
Asimetría	1,08	1,04	1,1	1,03	1,09

Tabla 25: Propiedades analíticas ($n=3$) del método en gradiente desarrollado, a un flujo de 6 mL/min. y a una temperatura de columna de 30 °C.

IV. 1. 2. 4. Robustez del método.

En este apartado se estudiará la robustez del método respecto al volumen de inyección empleado y respecto al porcentaje de metanol en la muestra. Es de especial importancia realizar aquí este estudio debido al elevado flujo de disolvente que se utiliza con el método desarrollado.

Volumen de inyección

Para determinar la robustez del método frente al volumen de inyección se han realizado análisis empleando distintos volúmenes de inyección (10, 20, 30, 40 y 50 μ l), usando un extracto del pimiento picante cayena. Se comprobó el efecto de esta variable en

los parámetros factor de capacidad de los picos cromatográficos, en las resoluciones cromatográficas de los picos y en las áreas de los picos cromatográficos. Cada ensayo se ha llevado a cabo por triplicado.

En la tabla 26 se muestran los valores medios de los factores de capacidad (k) de los picos cromatográficos de los capsaicinoides estudiados al variar el volumen de inyección entre 10 y 50 μL . Se ha realizado un análisis de la varianza de estos resultados, no encontrándose diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores para cada uno de los capsaicinoides estudiados.

Volumen	<i>n-DHC</i>	<i>C</i>	<i>DHC</i>	<i>h-C</i>	<i>h-DHC</i>
10 μl	11,382	12,245	15,676	16,667	19,912
20 μl	11,441	12,314	15,725	16,735	19,971
30 μl	11,568	12,451	15,882	16,882	20,058
40 μl	11,627	12,529	15,892	16,852	20,039
50 μl	11,519	12,412	15,833	16,843	20,019

Tabla 26: Valores medios ($n=3$) de los factores de capacidad (k) de los capsaicinoides estudiados al modificar los volúmenes de inyección (10-50 μL).

Puede concluirse que los factores de capacidad no están influenciados al variar el volumen de inyección en el intervalo comprendido entre 10 y 50 μL , como puede observarse en la tabla 26.

Respecto a la influencia del área de los picos al modificar los volúmenes de inyección (10-50 μL), se han realizado curvas de regresión para cada uno de los capsaicinoides estudiados, para comprobar de esta manera la linealidad de las curvas. Los resultados obtenidos vienen recogidos en la tabla 27.

Capsaicinoide	<i>n-DHC</i>	<i>C</i>	<i>DHC</i>	<i>h-C</i>	<i>h-DHC</i>
r^2	0,9978	0,9986	1	0,9982	0,9986
DER b (%)	2,71	2,18	0,31	2,42	2,19

Tabla 27: Valores de r^2 y de las DER de la pendiente (%) de las curvas de regresión de los capsaicinoides estudiados al modificar los volúmenes de inyección (10-50 μL).

Puede comprobarse una buena linealidad de las curvas de calibrado al modificar los volúmenes de inyección presentándose valores muy pequeños (DER b < 2,71 %) para las desviaciones estándares relativas de la pendiente. Por tanto, en lo que respecta a las áreas de los picos cromatográficos, se trata de un método robusto frente a variaciones en los volúmenes de inyección.

Con respecto a la influencia en la resolución al modificar los volúmenes de inyección, se ha realizado un análisis de la varianza de un factor. Los datos obtenidos vienen recogidos en la tabla 28.

Volumen	<i>n</i> -DHC	<i>C</i>	<i>DHC</i>	<i>h</i> - <i>C</i>	<i>h</i> - <i>DHC</i>
10 µl	1,73 ^a	6,72 ^a	1,84 ^a	5,92 ^a	8,54 ^{a,b}
20 µl	1,75 ^a	6,73 ^a	1,77 ^{a,b}	5,84 ^a	8,71 ^{a,b}
30 µl	1,76 ^a	6,62 ^a	1,8 ^{a,b}	5,79 ^a	8,83 ^a
40 µl	1,70 ^a	6,36 ^b	1,72 ^b	5,54 ^b	8,41 ^b
50 µl	1,54 ^b	6,16 ^c	1,62 ^c	5,27 ^c	8,37 ^b

Tabla 28: Valores medios ($n=3$) de la resolución de los capsaicinoides estudiados al modificar los volúmenes de inyección (10-50 µL). Valores con distinta letra en superíndice (a-b-c) en la misma columna son significativamente distintos ($P < 0,05$).

Se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas con respecto a la resolución de los picos cromatográficos con volúmenes de inyección comprendidos entre 10 y 30 µL. A partir de 40 µL se observa que los valores de resolución empiezan a ser significativamente diferentes en el caso de la capsaicina, dihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina. Este hecho hace que se nos limite el volumen de inyección para el método desarrollado a 30 µL para los valores de concentración de los capsaicinoides empleados en estos análisis.

Disolvente de la muestra.

Por el motivo comentado en el apartado anterior, se evaluó la robustez frente al cambio del porcentaje de metanol en la muestra. Para ello, se emplearon una serie de extractos con distintos porcentajes de metanol (25, 50, 75 y 100 %) en agua. Se ha estudiado el efecto del porcentaje de metanol en el área de los picos, en el factor de capacidad y en la resolución cromatográfica de los mismos. Para ello se ha llevado a cabo un análisis de la varianza de un factor para cada uno de los parámetros que se pretenden estudiar. El volumen de extracto inyectado ha sido de 25 µL. Los análisis se han realizado por triplicado.

Con respecto a los factores de capacidad (k) no se han encontrado diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores, para cada uno de los capsaicinoides, al realizar el análisis de la varianza de un factor al modificar los porcentajes de metanol en la muestra (25-100 %).

% MeOH	<i>n</i> -DHC	<i>C</i>	<i>DHC</i>	<i>h</i> - <i>C</i>	<i>h</i> - <i>DHC</i>
100	11,735	12,647	15,971	16,941	20,029
75	11,529	12,412	15,823	16,794	19,941
50	11,441	12,323	15,735	16,705	19,912
25	11,529	12,412	15,794	16,794	19,971

Tabla 29: Valores medios ($n=3$) de los factores de capacidad (k) de los capsaicinoides estudiados al modificar el porcentaje de metanol en la muestra (25-100 %).

A la vista de la tabla 29 se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas en los factores de capacidad al modificar el porcentaje de metanol en la muestra (25-100 %). Por lo tanto, los factores de capacidad de los capsaicinoides no se verán alterados al modificar los porcentajes de metanol en la muestra a analizar.

Con respecto a la resolución de los picos cromatográficos correspondientes a los capsaicinoides, también se ha realizado un análisis de la varianza de un factor. Los valores medios de resolución obtenidos vienen recogidos en la tabla 30, no habiéndose observado diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores medios de las resoluciones.

% MeOH	<i>n</i> -DHC	<i>C</i>	<i>DHC</i>	<i>h</i> - <i>C</i>	<i>h</i> - <i>DHC</i>
100	1,80	6,59	1,79	5,75	8,29
75	1,75	6,56	1,74	5,68	8,32
50	1,74	6,58	1,71	5,69	8,34
25	1,75	6,51	1,76	5,80	8,23

Tabla 30: Valores medios ($n=3$) de la resolución de los capsaicinoides estudiados al modificar los porcentajes de metanol (25-100 %) en los extractos.

A la vista de la tabla 30 se deduce que la resolución de los picos cromatográficos correspondientes a los capsaicinoides estudiados no se verá alterada al modificar los porcentajes de metanol en la muestra a analizar, tal como ocurría con los factores de capacidad.

Por otro lado sí se han observado diferencias significativas con las áreas de los picos al variar los porcentajes de metanol en los extractos, tal y como se recoge en la tabla 31.

% MeOH	<i>n</i> -DHC	<i>C</i>	<i>DHC</i>	<i>h</i> - <i>C</i>	<i>h</i> - <i>DHC</i>
25	16883 ^a	65076 ^a	55932 ^a	4916 ^a	5323 ^a
50	17096 ^a	65218 ^a	55919 ^a	4984 ^a	5370 ^a
75	17224 ^a	65626 ^a	56043 ^a	4970 ^a	5458 ^a
100	14750 ^b	56697 ^b	48142 ^b	4210 ^b	4708 ^b

Tabla 31: Áreas medias ($n=3$) correspondientes a los distintos porcentajes de metanol (25-100 %) en los extractos. Valores con distinta letra en superíndice (*a*-*b*) en la misma columna son significativamente distintos ($P < 0,05$).

Se observa que los valores de las áreas correspondientes a extractos que presentan un porcentaje de metanol del 100 % son significativamente diferentes que el resto.

Por tanto, observamos que dicho método presenta una elevada robustez con respecto a los factores de capacidad y a las resoluciones al modificar los porcentajes de metanol en los extractos, pero la robustez del método es menor respecto a las áreas de los picos cromatográficos. Por lo tanto, en el caso de muestras cuyo porcentaje de metanol supere el 75 % es necesario proceder a eliminar parte del metanol o bien diluir con agua para poder utilizar el método desarrollado. Por debajo de este nivel de metanol no sería necesario preocuparse del mismo.

IV. 1. 2. 5. Conclusiones.

En este trabajo se ha desarrollado un método rápido y reproducible para la separación de capsaicoides usando columnas monolíticas. Se ha conseguido acortar notablemente el tiempo de análisis (7,22 minutos *vs* tiempos de análisis tradicionales mediante CLAE) de los 5 capsaicoides mayoritarios (nordihidrocapsaicina, capsaicina, dihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina) presentes en los pimientos picantes.

El método desarrollado utiliza una temperatura de trabajo en la columna 30 °C y un flujo de 6 mL/min. En estas condiciones se consigue obtener un método rápido de separación y análisis de los capsaicoides con una alta repetibilidad y reproducibilidad del método (DER < 2 %) tanto para el área de pico, como para el factor de capacidad de los capsaicoides y para la resolución de los picos cromatográficos.

Se ha observado que este método desarrollado ha resultado ser robusto respecto al área de los picos y al factor de capacidad de los mismos al modificar los volúmenes de inyección de las muestras, siendo solamente robusto hasta volúmenes de inyección de 30 µL si consideramos las resoluciones. También resulta ser robusto respecto al factor de capacidad y resolución de los picos cromatográficos al modificar el porcentaje de metanol de los extractos. Sin embargo se han encontrado diferencias significativas cuando la composición del disolvente en el que está disuelta la muestra es de 100 % metanol, si se considera las áreas de los picos, no encontrándose diferencias para muestras donde este valor oscile entre el 0 y el 75 %.

IV. 1. 3. Comparación de los métodos desarrollados con la columna C-18 convencional y con la columna monolítica.

Una vez desarrollados los dos métodos de análisis de capsaicinoides en pimientos mediante el empleo de dos columnas de separación de cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa, se ha llevado a cabo una comparación de las propiedades analíticas de ambos métodos.

➤ Las propiedades analíticas del método desarrollado con la **columna C-18** convencional vienen resumidas a continuación:

- **Flujo de disolvente:** 0,8 mL/min.
- **Temperatura de la columna:** 35 °C
- **DER repetibilidad** < 3,40 %
- **DER reproducibilidad** < 3,92 %
- **Robustez alta** respecto al **volumen de inyección.**
- **Robustez baja** respecto al **porcentaje de metanol** en la muestra.
- **LD y LQ** de la capsaicina: **0,009** y **0,029** ppm.
- **LD y LQ** de la dihidrocapsaicina: **0,008** y **0,028** ppm.
- **Tiempo total** del método (incluido lavado y equilibrado de columna): 60 minutos.
- **Longitud de la columna:** 150 mm.
- **Precio** de la columna C-18 convencional: **750 €.**

	<i>n-DHC</i>	<i>C</i>	<i>DHC</i>	<i>h-C</i>	<i>h-DHC</i>
T. Ret. (min.)	14,03	14,84	19,42	20,35	24,67
k	11,21	11,91	15,89	16,71	20,47
Resolución	1,56	8,47	n.d.	n.d.	9,67
Anchura (min.)	0,50	0,53	0,57	0,69	0,57
Asimetría	1,43	1,46	1,29	1,27	1,35

Tabla 32: Propiedades analíticas ($n=3$) del método en gradiente desarrollado, a un flujo de 0,8 mL/min. y a una temperatura de columna de 35 °C para la columna C-18 convencional. n.d. (no disponible, picos parcialmente solapados).

➤ Las propiedades analíticas del método desarrollado con la columna **monolítica** vienen resumidas a continuación:

- **Flujo de disolvente:** 6 mL/min.
- **Temperatura de la columna:** 30 °C
- **DER repetibilidad** < 1,72 %
- **DER reproducibilidad** < 1,98 %
- **Robustez alta** respecto al **volumen de inyección** salvo para la resolución de los picos a volúmenes de inyección altos.
- **Robustez alta** respecto al **porcentaje de metanol** en la muestra.
- **LD y LQ** de la capsaicina: **0,008** y **0,028** ppm.
- **LD y LQ** de la dihidrocapsaicina: **0,011** y **0,036** ppm.
- **Tiempo total** del método (incluido lavado y equilibrado de columna): 30 minutos.
- **Longitud de la columna:** 100 mm.
- **Precio** de la columna monolítica: **600 €**

	<i>n-DHC</i>	<i>C</i>	<i>DHC</i>	<i>h-C</i>	<i>h-DHC</i>
T. Ret. (min.)	4,31	4,63	5,80	6,15	7,22
k	11,69	12,61	16,07	17,08	20,24
Resolución	1,77	6,62	1,86	5,90	8,16
Anchura (min.)	0,18	0,18	0,18	0,19	0,17
Asimetría	1,08	1,04	1,1	1,03	1,09

Tabla 33: Propiedades analíticas ($n=3$) del método en gradiente desarrollado con la columna monolítica, a un flujo de 6 mL/min. y a una temperatura de columna de 30 °C.

IV. 1. 3. 1. Comparación.

Se puede observar que las mayores diferencias entre ambos métodos están en el tiempo de separación de los picos, en el tiempo total del análisis y en el flujo de disolvente que emplean.

Como cabía esperar, las columnas monolíticas separan los capsaicinoides en un tiempo de análisis muy inferior al que requieren las columnas convencionales. Se observa que el método desarrollado con la columna convencional, separa los capsaicinoides en un tiempo en torno a 25 minutos, mientras que las columnas monolíticas tan solo requieren un tiempo de 7,22 minutos para que se eluya el último capsaicinoide estudiado. Por lo tanto, las columnas monolíticas acortan los tiempos de análisis en torno a 3,5 veces para los capsaicinoides en estas condiciones de operación.

El tiempo real de los métodos, si tenemos en cuenta el lavado de la columna con metanol y el equilibrado de la columna en las condiciones iniciales del método es de 60 minutos para la columna convencional, mientras que el método empleando la columna monolítica dura 30 minutos. Por lo tanto, se observa que podremos realizar el doble de análisis si empleamos una columna monolítica a si empleamos una columna convencional.

Respecto al flujo de disolvente utilizado se observa que las columnas monolíticas consumen una gran cantidad de disolvente (6 mL/min.) mientras que la columna convencional tan solo consume 0,8 mL/min. Esto hace que el consumo de disolvente y por tanto el consumo de dinero sea muy superior cuando se utilizan columnas monolíticas, siendo este gasto de operación mucho menor al emplear columnas convencionales. Además, el uso de columnas monolíticas, por el mismo motivo, presenta un perjuicio medioambiental superior que el uso de columnas convencionales.

Respecto a los límites de detección y cuantificación de la capsaicina y de la dihidrocapsaicina, ambos métodos presentan valores muy similares, pudiéndose utilizar ambos métodos para detectar cantidades muy pequeñas de capsaicinoides, en torno a 0,008 ppm.

Si se comparan los valores de las DER (%) de la repetibilidad y de la reproducibilidad de los dos métodos optimizados, se observa que el método desarrollado mediante la columna monolítica presenta valores inferiores en el error, tanto para la repetibilidad como para la reproducibilidad. Estos errores son prácticamente el doble en el método desarrollado con la columna convencional, a pesar de ser muy pequeños.

Observando la robustez de los gradientes desarrollados, el método optimizado con la columna monolítica presenta una alta robustez tanto para el volumen de inyección como para el porcentaje de metanol en la muestra. El método desarrollado con la columna convencional presenta tan solo alta robustez con el volumen de inyección de la muestra. Por lo tanto, presenta mejores propiedades frente a la robustez del método el que se ha desarrollado con la columna monolítica. Esto debe ser consecuencia de la mayor cantidad de fase móvil empleada en el método con la columna monolítica, que hace menos notorio el efecto del metanol en la muestra.

Los factores de capacidad (k) de los picos cromatográficos en ambos métodos son muy similares. Por el contrario se observa que la anchura de los picos es muy inferior en el método desarrollado con la columna monolítica. También el método desarrollado con la columna monolítica presenta valores de asimetría de los picos mucho mejores que los valores de asimetría que presenta el método con la columna convencional.

También cabe reseñar que el método de separación con la columna convencional no presenta una buena separación de la dihidrocapsaicina y de la homocapsaicina, no obteniéndose buenos valores para la resolución. El método desarrollado con la columna monolítica si presenta buenos valores para la resolución de todos sus picos cromatográficos.

IV. 1. 3. 2. Conclusiones.

A la hora de ver qué método es el más apropiado para analizar los capsaicinoides presentes en los extractos procedentes de muestras de pimientos, se tienen que analizar distintos aspectos.

Si se dispone de un gran número de muestras a analizar, convendría utilizar el método mediante la columna monolítica, ya que este método tiene un tiempo de duración inferior (30 minutos respecto 60 minutos) con la columna convencional.

Si se disponen de pocas muestras para analizar, el dispositivo cromatográfico está disponible para el uso y la disponibilidad de los resultados del análisis no requiere de una elevada premura, el método más aconsejable sería el desarrollado con la columna convencional. Esto sería debido al escaso consumo de disolvente que presentan las columnas convencionales en comparación con el que se consume con las columnas monolíticas, lo que hace que el gasto de disolvente y la contaminación medioambiental sean menores.

IV. 2. DESARROLLO DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE CAPSAICINOIDES EN PIMIENTOS.

En éste segundo capítulo de la tesis doctoral se abordará el desarrollo de distintos métodos de extracción de los 5 capsaicinoides mayoritarios (nordihidrocapsaicina, capsaicina, dihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina) presentes en los pimientos picantes.

Para la cuantificación de los capsaicinoides extraídos con los distintos métodos desarrollados, se han empleado los métodos de cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) en fase inversa mediante detección de fluorescencia desarrollados en el capítulo anterior.

En relación a los métodos de extracción de capsaicinoides en pimientos se han desarrollado y optimizado tres métodos empleando tecnologías novedosas de extracción de compuestos naturales en alimentos, plantas y otras matrices como son:

- **Extracción asistida por ultrasonidos (EAU).**
- **Extracción mediante fluidos presurizados (EFP).**
- **Extracción asistida por microondas (EAM).**

Finalmente se ha realizado una comparación de los tres métodos de extracción desarrollados.

IV. 2. 1. Extracción asistida por ultrasonidos de capsaicinoides en pimientos.

Resumen.

En este apartado se ha llevado a cabo el desarrollo de un método de extracción de capsaicinoides en pimientos mediante el empleo de la extracción asistida por ultrasonidos (EAU).

Los parámetros que se han estudiado son: disolvente de extracción (metanol, etanol, acetonitrilo y agua), temperatura (10-60 °C), cantidad de muestra (0,2-2 gramos), volumen de disolvente (15-50 mL) y el tiempo de extracción (2-25 minutos). Las mejores condiciones han resultado ser: 50 °C como temperatura de extracción, 25 mL de disolvente, aproximadamente 1 gramo de pimiento fresco triturado y 10 minutos de extracción, empleando metanol 100 % como disolvente. Los capsaicinoides han resultado ser estables en las condiciones optimizadas de extracción. El método optimizado posee una alta reproducibilidad (DER < 3%).

IV. 2. 1. 1. Introducción.

La extracción asistida por ultrasonidos (EAU) es una técnica de extracción eficaz que ha sido poco estudiada para la extracción de los capsaicinoides. Esta técnica se ha estudiado con éxito en la extracción de un gran número de compuestos naturales procedentes de plantas y alimentos como pueden ser compuestos fenólicos en fresas²⁵⁰, isoflavonas en soja²⁵¹, azúcares en manzanas²⁵², ácidos orgánicos en uvas²⁵³, etc. Solamente hay algunas aplicaciones puntuales de la EAU para la extracción de los capsaicinoides en pimientos picantes, no habiéndose estudiado en profundidad esta técnica para estos compuestos²⁵⁴. La necesidad de dicho estudio llevó al desarrollo de un método de extracción de capsaicinoides en pimientos empleando la EAU, el cual se describe en este apartado.

Durante el desarrollo de un método de extracción asistido por ultrasonidos se deben evaluar diferentes disolventes de extracción, temperaturas, tiempos de extracción, volumen de disolvente, cantidad de muestra, así como la repetibilidad y reproducibilidad del método. El método se ha desarrollado evaluando la eficacia de extracción de los 5 capsaicinoides mayoritarios presentes en las variedades picantes de pimientos

²⁵⁰ M.C. Herrera, M.D. Luque de Castro. "Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection". *Journal of Chromatography A*, 1100: 1-7, 2005.

²⁵¹ M.A. Rostagno, M.Palma, C.G. Barroso. "Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones". *Journal of Chromatography A*, 1012: 119-128, 2003.

²⁵² F. Caili, T. Haijun, L. Quanhong, C. Tongyi, D. Wenjuan. "Ultrasound-assisted extraction of xyloglucan from apple pomace". *Ultrasonics Sonochemistry*, 13: 511-516, 2006.

²⁵³ M. Palma, C.G. Barroso. "Ultrasound-assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products". *Analytica Chimica Acta*, 458: 119-130, 2002.

²⁵⁴ R. Karnka, M. Rayanakorn, S. Watanesk, Y.Vaneesorn. "Optimization of high-performance liquid chromatographic parameters for the determination of capsaicinoids compounds using the simplex method". *Analytical Sciences*, 18: 661-665, 2002.

(nordihidrocapsaicina, capsaicina, dihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina).

IV. 2. 1. 2. Materiales y métodos.

Muestra.

Para el desarrollo del método de EAU se ha empleado el pimiento picante cayena (*Capsicum frutescens*). Los pimientos fueron pelados separándoles el pedúnculo y las pepitas. Únicamente el pericarpio y la placenta del pimiento han sido estudiados. Tanto el pericarpio como la placenta han sido triturados con una batidora convencional, hasta que se obtuvo una muestra homogénea para el análisis. La muestra triturada obtenida se ha conservado en el congelador a -32 °C hasta su análisis.

Procedimientos de extracción.

En un matraz erlenmeyer de 50 mL se pesaba la cantidad de muestra de pimiento a extraer, y se añadía el volumen de disolvente que en cada extracción fuera a necesitarse. Una vez adicionado el disolvente se introducían los matraces dentro del baño de ultrasonidos, el cual estaba a la temperatura a la que se fueran a realizar las extracciones. Una vez finalizada la extracción, se procedía al enfriamiento del erlenmeyer si se había realizado la extracción a una temperatura elevada (50-60 °C). Una vez atemperado el extracto, se adicionaban 0,5 mL de patrón interno (\approx 1000 ppm de 2,5-dihidroxibenzaldehído) como sistema de corrección de volumen. Se tomaba una pequeña porción del extracto con una jeringuilla y se filtraba con un filtro de jeringa de nylon de 0,45 μ m para el posterior análisis cromatográfico. Los parámetros de extracción que se han empleado han sido los siguientes:

Disolventes: metanol, etanol, acetonitrilo y agua

Temperatura: 10-60 °C

Potencia: 360 W

Volumen de disolvente: 15-50 mL

Cantidad de muestra: 0,2-2 gramos de pimiento picante cayena fresco

Tiempo de extracción: 2-25 minutos

Cromatografía Líquida de Alta Eficacia.

Los análisis de los extractos de pimientos durante el estudio se llevaron a cabo empleando el método cromatográfico desarrollado en el apartado IV.1.2 para la columna monolítica Chromolith Performance RP-18e (100 mm x 4,6 mm).

IV. 2. 1. 3. Resultados y discusión.

Disolvente.

La selección del disolvente más apropiado a la hora de extraer los analitos de interés de la matriz de la muestra es un paso fundamental a la hora de desarrollar cualquier método de extracción. Por un lado la efectividad de la extracción asistida por ultrasonidos (EAU) va a depender de la capacidad que tenga el disolvente de extracción para absorber y transmitir la energía de los ultrasonidos. Además, los capsaicinoides deben de ser solubles en el disolvente que empleemos para la extracción.

Los disolventes que se han estudiado para extraer los capsaicinoides de la matriz de la muestra han sido el metanol, etanol, acetonitrilo y agua. El metanol^{255,256}, etanol^{257,258} y acetonitrilo^{259,260} son disolventes que se emplean normalmente para la extracción de capsaicinoides en diversas técnicas de extracción, como pueden ser la extracción soxhlet, la maceración, o la extracción mediante agitación magnética. El agua no es un buen disolvente a la hora de extraer capsaicinoides, pero se ha observado que en determinadas ocasiones, la adición de pequeños porcentajes de agua en el disolvente de extracción, ayuda a incrementar la eficacia de extracción de los analitos de interés de la muestra.²⁶¹

Las extracciones se han realizado con una cantidad de pimiento picante cayena triturado en torno a 1 g de muestra, en 25 mL de disolvente, a una temperatura de 50 °C durante 20 minutos de extracción. Todos los ensayos se han realizado por triplicado.

En la figura 40 se representan las áreas relativas de los distintos capsaicinoides extraídos con los 4 disolventes estudiados en las condiciones de extracción anteriormente expuestas.

²⁵⁵ P. Kirschbaum-Titze, C. Hiepler, E. Mueller-Seitz, M. Petz. "Pungency in Paprika (*Capsicum annum*). 1. Decrease of capsaicinoid content following cellular disruption". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 1264-1266, 2002.

²⁵⁶ R. Karnka, M. Rayanakorn, S. Watanesk, Y. Vaneesorn. "Optimization of high-performance liquid chromatographic parameters for the determination of capsaicinoids compounds using the simplex method". Analytical Sciences, 18: 661-665, 2002.

²⁵⁷ R.I. Santamaría, M.D. Reyes-Duarte, E. Bárzana, D. Fernández, F.M. Gama, M. Mota, A. López-Munguía. "Selective enzyme-mediated extraction of Capsaicinoids and Carotenoids from Chili Guajillo Puya (*Capsicum annum L.*) using ethanol as solvent". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48: 3063-3067, 2000.

²⁵⁸ G.F. Barbero, M. Palma, C.G. Barroso. "Pressurized liquid extraction of capsaicinoids from peppers". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 3231-3236, 2006.

²⁵⁹ B. Estrada, M.A. Bernal, J. Díaz, F. Pomar, F. Merino. "Fruit development in capsicum annum: changes in capsaicin, lignin, free phenolics, and peroxidase patterns". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48 (12): 6234-6239, 2000.

²⁶⁰ M. Contreras-Padilla, E.M. Yahia. "Changes in capsaicinoids during development, maturation, and senescence of Chile peppers and relation with peroxidase activity". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46: 2075-2079, 1998.

²⁶¹ M. A. Rostagno, M. Palma, C.G. Barroso. "Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones". Journal of Chromatography A, 1012: 119-128, 2003.

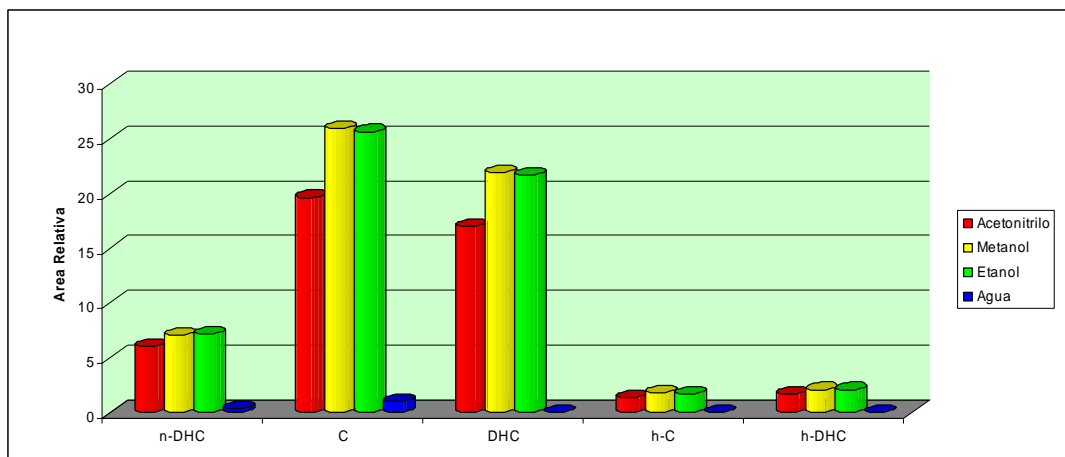


Figura 40: Recuperaciones relativas de capsaicinoides a partir del pimiento picante cayena empleando diferentes disolvente puros.

Se puede observar que tanto el metanol, como el etanol, extraen cantidades de capsaicinoides similares, no observándose diferencias significativas en las recuperaciones obtenidas con estos dos disolventes en las condiciones de extracción estudiadas. El acetonitrilo es un disolvente bastante eficaz a la hora de extraer los capsaicinoides presentes en muestras de pimientos picantes, pero no tan eficaz como pueden ser el etanol y el metanol, obteniéndose en estas condiciones de extracción recuperaciones en torno al 80 % de las que se obtienen con estos dos disolventes. Teniendo en cuenta la composición de la fase móvil en el análisis posterior de la muestra por CLAE para una mayor compatibilidad con la misma, se optó por el metanol como disolvente de extracción frente al etanol.

En la figura 40 también se observa que el agua, que es un disolvente muy polar, tiene poca capacidad de extracción de capsaicinoides. Este efecto se acentúa a la hora de extraer los capsaicinoides menos polares como pueden ser la dihidrocapsaicina, la homocapsaicina o la homodihidrocapsaicina, extrayendo un porcentaje mucho menor de estos capsaicinoides que de otros capsaicinoides más polares como la nordihidrocapsaicina o la capsaicina (5,71 y 4,20 % de recuperación para la nordihidrocapsaicina y capsaicina vs 0,21, 0 y 0 % de recuperación para la dihidrocapsaicina, la homocapsaicina y la homodihidrocapsaicina respectivamente).

En cambio, se ha comprobado que en muchas ocasiones, la adición de pequeñas cantidades de agua a los disolventes de extracción mejoran las propiedades extractantes de éstos. Por tal motivo se ha llevado a cabo el estudio de la adición de determinados porcentajes de agua (0, 10, 25, 50 y 100 %) al metanol, para ver como se modifican las propiedades de extracción de este disolvente. Las condiciones de extracción han sido las mismas empleadas para la selección del disolvente óptimo de extracción. De igual forma, todos los ensayos se han realizado por triplicado.

En la tabla 34 se representan los porcentajes de capsaicinoides extraídos del pimiento picante cayena empleando como disolventes diferentes mezclas metanol/agua (0, 50, 75, 90 y 100 % de metanol).

Muestra	<i>n</i> -DHC	<i>C</i>	<i>DHC</i>	<i>h</i> - <i>C</i>	<i>h</i> - <i>DHC</i>
0 % Met.	5,71	4,20	0,21	0	0
50 % Met.	71,66	71,00	67,46	65,01	63,10
75 % Met.	79,34	79,52	79,36	79,37	79,19
90 % Met.	86,61	86,81	87,14	86,98	87,23
100 % Met.	100	100	100	100	100

Tabla 34: Porcentajes relativos de capsaicinoides extraídos del pimiento picante cayena empleando como disolventes diferentes mezclas metanol/agua (0, 50, 75, 90 y 100 % de metanol).

Puede comprobarse que la adición de pequeñas cantidades de agua al metanol no produce un efecto beneficioso a la hora de extraer los capsaicinoides presentes en las muestras frescas de pimientos. Pequeñas adiciones de agua, como puede ser un 10 % de agua en el metanol, hace que en estas condiciones de extracción las recuperaciones obtenidas estén en torno al 87 % de las que se obtendrían con metanol puro. Porcentajes mayores de agua, como pueden ser un 25 %, hace que las recuperaciones obtenidas sean aun menores, en torno al 79 %, continuando bajando las recuperaciones a medida que se aumenta el porcentaje de agua en el metanol. Por todo ello se decidió que el disolvente óptimo de extracción de los capsaicinoides a la hora de emplear la extracción asistida por ultrasonidos es el metanol 100 %.

Temperatura de extracción.

La temperatura es un parámetro fundamental a la hora de extraer compuestos. Por lo general al aumentar la temperatura se aumenta la velocidad y la eficacia en el proceso de extracción, salvo que se lleguen a temperaturas tales que se empiecen a producir degradaciones de los compuestos de interés. En este trabajo se pretendían evaluar temperaturas comprendidas entre 10 y 60 °C (10, 20, 30, 40, 50 y 60 °C). No se plantearon utilizar temperaturas superiores debido al punto de ebullición del metanol (64,7 °C) y trabajar a presión atmosférica.

Las condiciones de extracción en este estudio han sido las siguientes: disolvente de extracción: metanol; tiempo de extracción: 10 minutos; volumen de disolvente: 25 mL; cantidad de muestra: aproximadamente 1 gramo. Todos los ensayos han sido llevados a cabo por triplicado.

En la figura 41 se representa el área relativa de los capsaicinoides extraídos a las distintas temperaturas del ensayo.

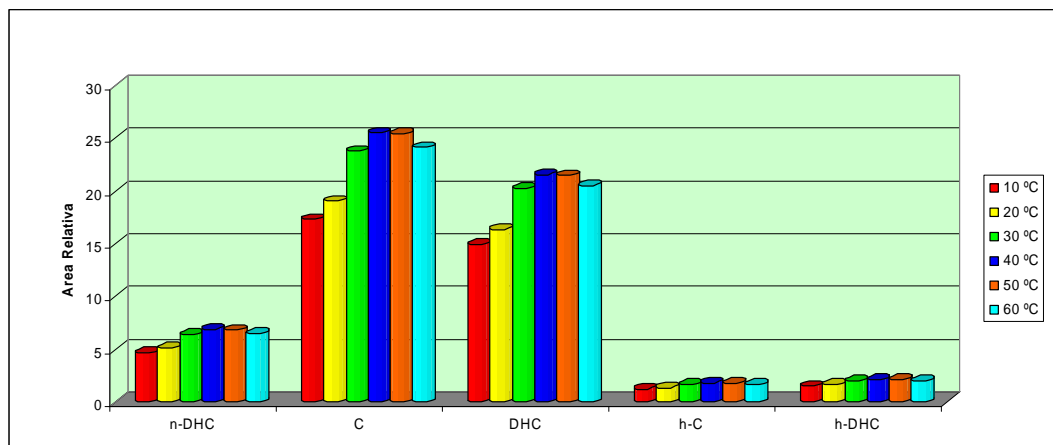


Figura 41: Área relativa de los capsaicinoides extraídos a las distintas temperaturas del ensayo (10, 20, 30, 40, 50 y 60 °C).

Puede comprobarse que en estas condiciones de extracción, las mayores recuperaciones se obtienen a 40 y 50 °C, no observándose diferencias apreciables entre ambas temperaturas. A temperaturas inferiores a 40 °C, no se logra extraer la misma cantidad de capsaicinoides que se extraen a mayores temperaturas, debido a que la cinética de extracción se hace más lenta a medida que la temperatura disminuye. A temperaturas superiores a 50 °C (60 °C), de nuevo volvemos a obtener recuperaciones de capsaicinoides inferiores a las que se obtienen a 40 y 50 °C, debido seguramente a la degradación de los capsaicinoides a temperaturas elevadas.

Por todo ello se ha considerado que las temperaturas adecuadas de extracción de capsaicinoides son las comprendidas entre 40 y 50 °C, fijando 50 °C como temperatura para el posterior trabajo de desarrollo del método.

Tiempo de extracción.

El tiempo de extracción es también un parámetro de enorme importancia a la hora de optimizar cualquier método de extracción. Por lo general al aumentar el tiempo de extracción se incrementa la cantidad de analitos extraídos, salvo que se produzcan degradaciones.

Para determinar el tiempo necesario para obtener extracciones completas, se realizaron extracciones de muestras de pimientos a distintos tiempos de extracción. Se han evaluado tiempos de extracción de 2, 5, 10, 15, 20 y 25 minutos. El resto de variables empleadas han sido: 50 °C de temperatura, metanol como disolvente de extracción, 25 mL de disolvente y aproximadamente 1 gramo de muestra. Todos los ensayos se han realizado por triplicado. Los resultados obtenidos vienen recogidos en la figura 42.

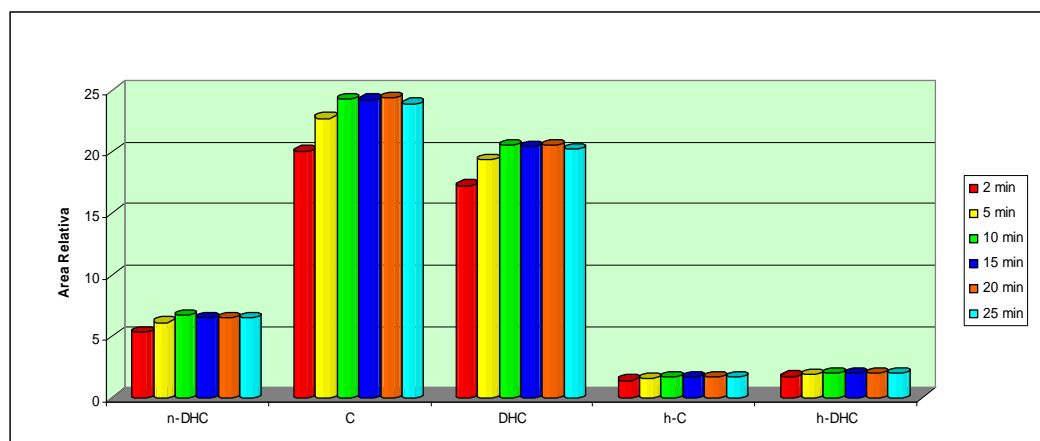


Figura 42: Recuperaciones de capsaicinoides a partir de pimiento picante cayena empleando diferentes tiempos de extracción (2, 5, 10, 15, 20 y 25 minutos).

A la vista de la figura 42 se observa que a partir de 10 minutos de extracción, se consiguen recuperaciones cuantitativas de los capsaicinoides presentes en las muestras frescas de pimientos. No se observan diferencias apreciables de las recuperaciones que se obtienen con 10 o más minutos de extracción (15, 20 ó 25 minutos).

A tiempos inferiores de 10 minutos se consiguen recuperaciones menores que las que se obtienen con 10 minutos de extracción. Por ejemplo, en 5 minutos de extracción en estas condiciones, se extrae en torno al 92 % de los capsaicinoides totales que se extraen en 10 minutos. Esta cifra disminuye en 2 minutos de extracción, obteniéndose en este tiempo en torno a un 82 % de los capsaicinoides totales.

Por tanto, puede concluirse que son necesarios al menos 10 minutos de extracción en las condiciones estudiadas para asegurarse que se produce una extracción cuantitativa de los capsaicinoides presentes en las muestras frescas de pimientos.

Volumen de disolvente.

La relación masa/volumen de disolvente es un factor que debe ser estudiado para incrementar la eficacia de extracción de los capsaicinoides empleando la extracción asistida por ultrasonidos. Para las técnicas convencionales de extracción sólido-líquido, la tendencia es disminuir la relación masa/volumen de disolvente, en muchas ocasiones aumentando el volumen de extracción. En esta circunstancia, la mejora es debida a que hay un mayor volumen de disolvente para extraer la misma cantidad de soluto.

Para evaluar el efecto del volumen del disolvente de extracción, se han llevado a cabo una serie de extracciones con distintos volúmenes de disolvente (15, 25, 40 y 50 mL). Las demás condiciones de extracción han sido: 50 °C de temperatura, aproximadamente 1 gramo de muestra, 10 minutos de extracción y metanol como disolvente. Todos los ensayos se han realizado por triplicado.

En la figura 43 se representan las cantidades relativas de capsaicinoides extraídos con distintos volúmenes de disolventes.

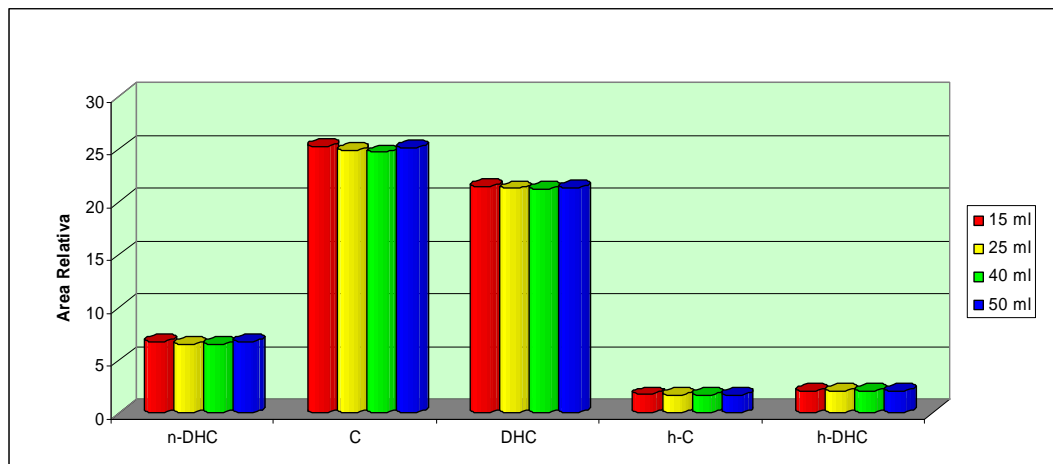


Figura 43: *Cantidades relativas de capsaicinoides extraídos con distintos volúmenes de metanol (15, 25, 40 y 50 mL).*

Puede verse como no hay diferencias apreciables al variar el volumen del disolvente de extracción. Por lo tanto, esta variable no será un factor determinante a la hora de extraer capsaicinoides en estas condiciones. Se decidió trabajar con un volumen de 25 mL ya que de esta manera se obtienen picos cromatográficos de área adecuada para minimizar los errores de integración de los cromatogramas.

Cantidad de muestra.

Una vez optimizado el volumen de disolvente de extracción, se pasó a optimizar la cantidad de muestra que es el otro factor perteneciente a la relación masa/volumen de disolvente de la que se habló anteriormente. Por lo general, al disminuir la cantidad de muestra manteniendo constante el volumen, se incrementan las cantidades de analitos extraídas, ya que disminuye la relación masa/volumen de disolvente.

En este trabajo se han estudiado cantidades de muestra de 0,2, 0,5, 1, 1,5 y 2 gramos de pimientos, manteniendo el volumen constante en 25 mL de metanol. Los demás parámetros de extracción que se han utilizado han sido: 50 °C de temperatura, 25 mL de metanol como disolvente de extracción y 10 minutos de extracción. Todos los ensayos se han realizado por triplicado. Los resultados obtenidos vienen recogidos en la figura 44.

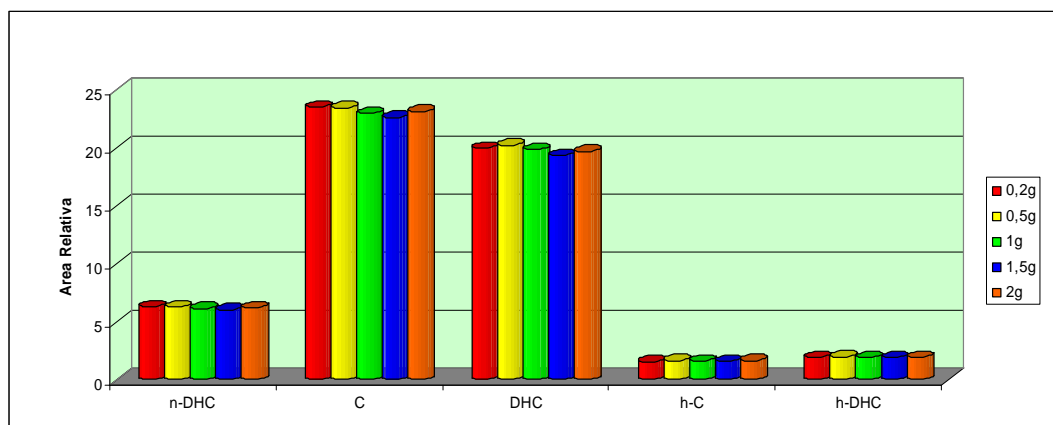


Figura 44: Recuperaciones de capsaicinoides a partir de pimiento picante cayena empleando diferentes cantidades de muestra (0,2, 0,5, 1, 1,5 y 2 gramos).

En la figura 44 se observa que la cantidad de muestra tampoco es un parámetro relevante. Así pues, se decidió emplear 1 gramo al ser una cantidad de muestra que produce picos cromatográficos de área suficiente para permitir integraciones fiables.

Repetibilidad y reproducibilidad del método.

Se ha estudiado la repetibilidad y la reproducibilidad del método desarrollado. Para ello se han realizado un total de 21 extracciones repartidas de la siguiente manera: 9 extracciones realizadas el primer día del estudio y 6 extracciones más en cada uno de los dos días consecutivos.

Las condiciones de extracción que se han empleado son las condiciones óptimas que se han desarrollado en este trabajo. Los resultados obtenidos expresados en tantos por ciento tanto para la repetibilidad como para la reproducibilidad vienen recogidos en la tabla 35.

	<i>n-DHC</i>	<i>C</i>	<i>DHC</i>	<i>h-C</i>	<i>h-DHC</i>
DER (%) repetibilidad	1,97	1,72	1,84	2,35	1,83
DER (%) reproducibilidad	2,42	2,46	2,56	2,37	2,58

Tabla 35: Repetibilidad ($n=9$) y reproducibilidad ($n=18$) del método desarrollado para los capsaicinoides analizados.

Se puede comprobar que trabajando en las condiciones optimizadas, los resultados presentan una alta repetibilidad y reproducibilidad (DER < 3 %).

IV. 2. 1. 4. Conclusiones.

En este trabajo se ha desarrollado un método rápido, sencillo, barato, reproducible y cuantitativo de extracción de capsaicinoides a partir de muestras frescas de pimientos utilizando la extracción asistida por ultrasonidos, no observándose degradación de estos compuestos hasta los 50 °C. El método desarrollado posee una desviación estándar relativa para la repetibilidad de un máximo del 2,35 % y reproducibilidad inferior al 3 %.

Los parámetros de extracción para capsaicinoides que se han desarrollado son los siguientes:

- **Temperatura:** 50 °C
- **Disolvente:** metanol 100 %
- **Tiempo:** 10 minutos de extracción
- **Volumen de disolvente:** 25 mL
- **Cantidad de muestra:** \approx 1 gramo de pimiento fresco triturado

IV. 2. 2. Extracción mediante fluidos presurizados de capsaicinoides en pimientos.

Resumen.

En este apartado se ha llevado a cabo el desarrollo de un método de extracción de capsaicinoides en pimientos mediante el empleo de fluidos presurizados.

En primer lugar se ha estudiado la estabilidad de la capsaicina y de la dihidrocapsaicina a diferentes temperaturas (50-200 °C), y posteriormente se han estudiado distintas variables de extracción como: disolvente (metanol, etanol y agua), distintos porcentajes de agua en el metanol (0-20 %) y en el etanol (0-20 %) y número de ciclos de extracción. Se ha realizado además un estudio de la repetibilidad ($DER \leq 6,73$ %) y de la reproducibilidad ($DER \leq 6,18$ %) del método.

IV. 2. 2. 1. Introducción.

La extracción mediante fluidos presurizados (EFP) es una técnica de extracción novedosa, en la cual se utiliza la temperatura y la presión para acelerar la extracción de compuestos procedentes de muestras sólidas o muestras semisólidas. La EFP suele ser más eficaz que las técnicas convencionales de extracción de compuestos naturales. Hasta el momento no hay ningún estudio sobre la extracción de capsaicinoides en pimientos u otras matrices mediante el empleo de esta técnica de extracción, aunque ha sido demostrada la efectividad de esta técnica con compuestos naturales en una gran cantidad de alimentos como uva²⁶², manzana²⁶³, malta²⁶⁴, soja²⁶⁵, etc. En este apartado se ha desarrollado un método analítico rápido para la determinación de capsaicinoides en pimientos mediante la EFP.

Durante el desarrollo del método se evaluarán diferentes disolventes de extracción, temperaturas, cantidades de muestra y número de ciclos de extracción. El empleo de altas temperaturas en la EFP es un especial atractivo de esta técnica ya que, como se ha mencionado anteriormente, la temperatura puede aumentar la eficacia de extracción. Sin embargo, esto requiere la determinación previa de la estabilidad de los compuestos de interés ya que estos compuestos pueden ser susceptibles de degradación. Por ello, como paso previo al desarrollo del método también se determinará la estabilidad de los capsaicinoides durante la EFP.

²⁶² Z. Piñeiro, M. Palma, C.G. Barroso. "Determination of catechins by means of extraction with pressurized liquids". *Journal of Chromatography A*, 1026: 19-23, 2004.

²⁶³ R.M. Alonso-Salcés, A. Barranco, E. Corta, L.A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente. "A validated solid-liquid extraction method for the HPLC determination of polyphenols in apple tissues: Comparison with pressurised liquid extraction". *Talanta*, 65: 654-662, 2005.

²⁶⁴ M. Papagiannopoulos, B. Zimmermann, A. Mellenthin, M. Krappe, G. Maio, R. Galensa. "Online coupling of pressurized liquid extraction, solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography for automated analysis of proanthocyanidins in malt". *Journal of Chromatography A*, 958: 9-16, 2002.

²⁶⁵ M. A. Rostagno, M. Palma, C. G. Barroso. "Pressurized liquid extraction of isoflavones from soybeans". *Analytica Chimica Acta*, 522: 169-177, 2004.

IV. 2. 2. Materiales y métodos.

Muestra.

De igual manera que se hizo con la extracción asistida por ultrasonidos, se ha utilizado el pimiento picante cayena (*Capsicum frutescens*) para el desarrollo del método de extracción mediante fluidos presurizados con el mismo tratamiento previo ya comentado.

Procedimientos de extracción.

La cámara de extracción era llenada con el disolvente de extracción (agua, etanol o metanol (0-20% en agua)), presurizada a 100 atmósfera de presión, y calentada a temperaturas comprendidas entre 50 y 200 °C. Las extracciones se han realizado con muestras frescas de pimientos, en torno a 1 gramo. Los extractos de pimientos (volúmenes inferiores a 50 mL) han sido enrasados con metanol hasta 50 mL y estas han sido las muestras que se han analizado mediante CLAE con detección de fluorescencia. Se han realizado extracciones a muestras frescas de pimientos y a los patrones de capsaicina y dihidrocapsaicina para el estudio de la estabilidad de los capsaicinoides.

a) La extracción de capsaicinoides a partir de muestras frescas de pimientos mediante fluidos presurizados se ha llevado a cabo empleando diferentes condiciones de extracción:

Disolvente: agua, metanol, etanol y mezclas con distintos porcentajes de agua (0-20 %)

Temperatura: 50-200 °C

Presión: 100 atmósferas

Cantidad de muestra: ≈ 1 gramo de pimientos frescos triturados

Ciclos de extracción estáticos: 1-3 ciclos de 5 minutos de duración

Lavado: 100 % del volumen de la cámara de extracción

Purga: 300 segundos

b) Para la determinación de la estabilidad durante la extracción con fluidos presurizados de los capsaicinoides se emplearon dos disoluciones: capsaicina (22,10 ppm) y dihidrocapsaicina (27,72 ppm) en metanol. Se estudiaron diferentes temperaturas de extracción (50-200 °C). Las condiciones empleadas durante el estudio fueron las siguientes.

Disolvente: metanol 100 %

Temperatura: 50-200 °C

Presión: 100 atmósferas

Cantidad de muestra patrón: 0,5 mL de las disoluciones patrones preparadas

Ciclos de extracción estáticos: 1 ciclos de 30 minutos de duración

Lavado: 100 % del volumen de la cámara de extracción

Purga: 300 segundos

El proceso de extracción es similar al de una extracción normal, a diferencia de que se emplea 0,5 mL de la disolución patrón de capsaicina o dihidrocapsaicina preparada.

Cromatografía Líquida de Alta Eficacia.

Para los análisis de los extractos obtenidos mediante cromatografía líquida de alta eficacia se han empleado el mismo método y las mismas condiciones aplicadas en el apartado IV. 2. 1.

IV. 2. 2. 3. Resultados y discusión.

Estabilidad de los capsaicinoides (capsaicina y dihidrocapsaicina) con la temperatura.

Se ha estudiado la estabilidad de la capsaicina y de la dihidrocapsaicina con la temperatura para determinar si se pueden emplear temperaturas elevadas en el método de extracción de capsaicinoides en muestras frescas de pimientos con fluidos presurizados sin que se produzca una degradación. Para ello se ha preparado una disolución patrón de capsaicina (22,1 ppm) y de dihidrocapsaicina (27,72 ppm) en metanol como disolvente. Las extracciones mediante fluidos presurizados han sido llevadas a cabo a una presión de 100 atmósferas y con un tiempo de extracción de 30 minutos. El disolvente empleado para la extracción ha sido metanol. Las temperaturas de extracción que han sido estudiadas son de 50, 100, 150, 175 y 200 °C.

Para llevar a cabo el estudio, 0,5 mL de la disolución patrón de capsaicina y de dihidrocapsaicina preparada, fueron introducidos en la cámara de extracción y mezclados con la fase sólida de relleno de la cámara (arena de mar de lavado grueso), llevándose posteriormente a cabo la extracción en las condiciones anteriormente señaladas durante 30 minutos. Se obtuvieron volúmenes de extracción inferiores a 25 mL, enrasando posteriormente el extracto obtenido a 25 mL para el análisis posterior mediante CLAE acoplado a un espectrofotómetro de fluorescencia.

Para asegurar que los patrones (capsaicina y dihidrocapsaicina) introducidos en la cámara de extracción no fueran arrojados fuera de la cámara antes o durante la extracción por el flushing automático del equipo que se produce cuando se alcanza una sobrepresión en el interior de la cámara, las válvulas de cierre del sistema fueron controladas manualmente, evitando de esta manera este proceso. Todos estos experimentos fueron llevados a cabo por duplicado.

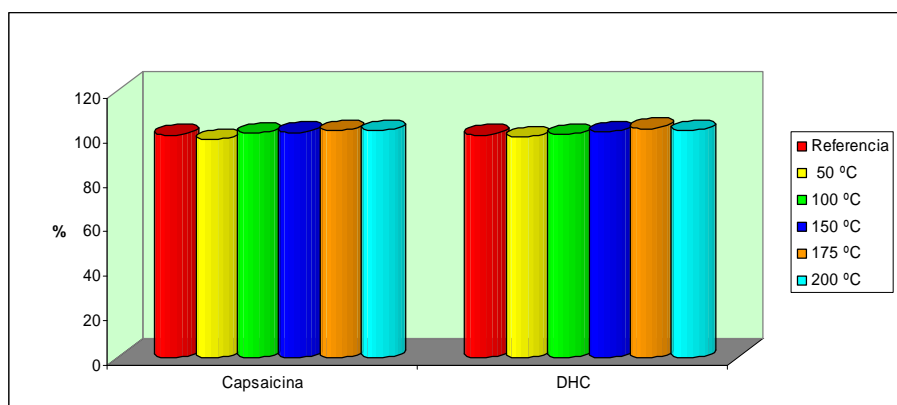


Figura 45: Porcentaje de capsaicina y dihidrocapsaicina recuperada de la disolución patrón mediante EFP a diferentes temperaturas (50, 100, 150, 175 y 200 °C).

Puede concluirse que no existe degradación ni de la capsaicina ni de la dihidrocapsaicina a medida que incrementamos la temperatura desde los 50 °C hasta 200 °C, dato que hace posible que se puedan realizar las extracciones de las muestras reales de pimientos a la temperatura de 200 °C.

Selección del disolvente de extracción.

En un principio se han analizado 3 disolventes de extracción: metanol, etanol y agua, todos ellos en estado puro. Las condiciones de extracción en este ensayo han sido las siguientes: Presión de extracción: 100 atmósferas; temperatura de extracción: 200 °C; cantidad de muestra: aproximadamente 1 gramo de pimiento picante cayena; tres ciclos de extracción de 5 minutos cada ciclo, lo que da un tiempo global de extracción con el precalentamiento de 30 minutos aproximadamente. La figura 46 muestra los resultados obtenidos.

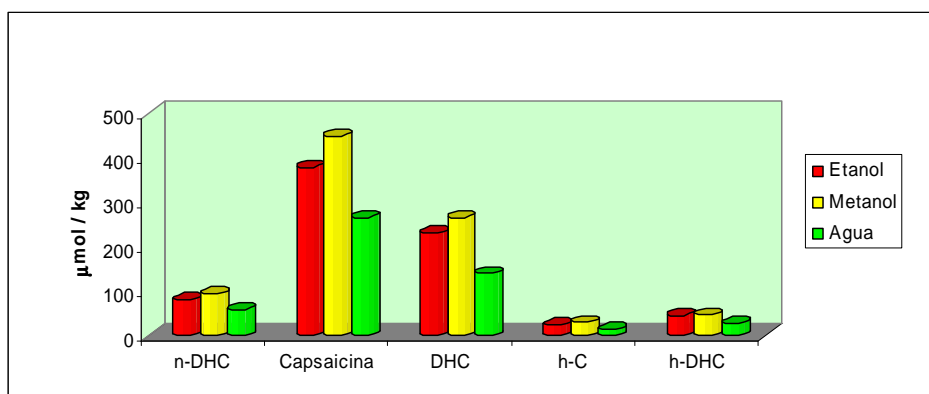


Figura 46: Cantidad de capsaicinoides ($\mu\text{mol}/\text{kg}$) extraídos con etanol, metanol y agua.

Se puede comprobar que las mayores cantidades de capsaicinoides son extraídos con metanol. El etanol consigue extraer cantidades de capsaicinoides similares a la del metanol, aunque algo inferiores, siendo el agua el peor disolvente de extracción a la hora de extraer capsaicinoides de muestras frescas de pimientos mediante la técnica de EFP de entre los tres disolventes estudiados.

Por otro lado, se ha comprobado que en muchas ocasiones, la adición de pequeñas cantidades de agua a los disolventes de extracción mejoran las propiedades extractantes de éstos. Por tal motivo se ha llevado a cabo el estudio de la adición de determinados porcentajes de agua (0, 10 y 20 % de agua) al etanol y al metanol, para ver como se modifican las propiedades de extracción de estos disolventes. Las condiciones de extracción han sido las mismas empleadas para la selección del disolvente óptimo de extracción. De igual forma, todos los ensayos se han realizado por triplicado.

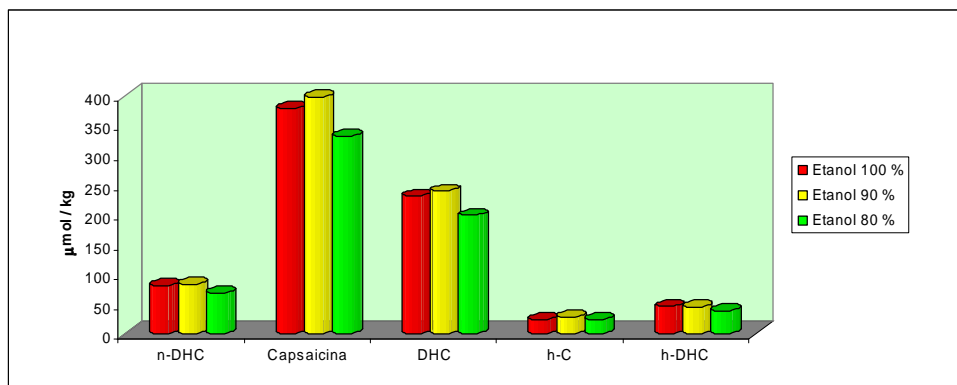


Figura 47: Cantidad de capsaicinoides ($\mu\text{mol}/\text{kg}$) extraídos con etanol (0-20 % H_2O)

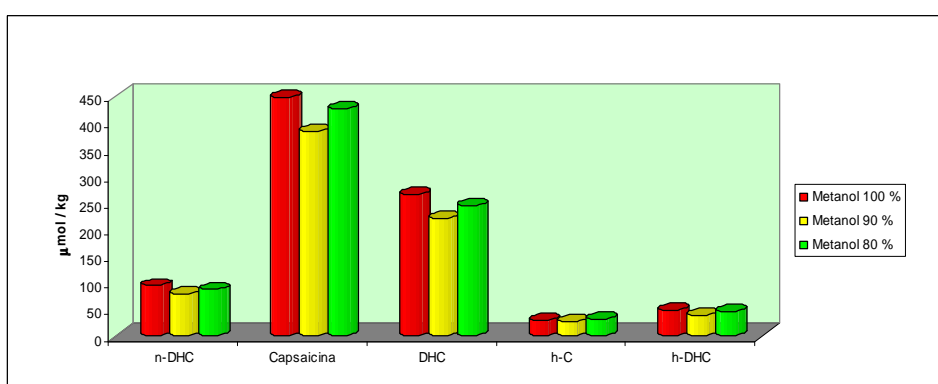


Figura 48: Cantidad de capsaicinoides ($\mu\text{mol}/\text{kg}$) extraídos con metanol (0-20 % H_2O)

A la vista de las figuras 10 y 11 en las que se representan las cantidades de capsaicinoides ($\mu\text{mol}/\text{kg}$) extraídos con etanol (0-20 % H_2O) y metanol (0-20 % H_2O), se observa que la mayor recuperación con etanol (fig. 47) se obtiene con un porcentaje de agua del 10 %. En cambio, la mayor recuperación con metanol (fig. 48) se obtiene con metanol puro sin adición de agua.

Dado que este último disolvente produce mayores recuperaciones se decidió continuar el desarrollo del método de extracción con 100 % de metanol.

Efecto del número de ciclos de extracción en la recuperación de capsaicinoides.

Se realizó un estudio para determinar la cantidad de capsaicinoides extraídos con 1, 2 y 3 ciclos de extracción de 5 minutos cada ciclo. Todos los análisis han sido llevados a cabo por triplicado.

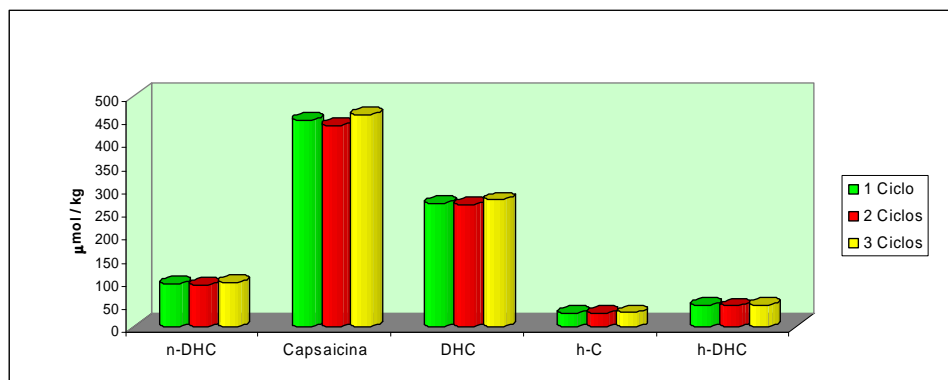


Figura 49: Cantidad de capsaicinoides ($\mu\text{mol/kg}$) extraídos con 1, 2 y 3 ciclos de extracción de 5 minutos cada ciclo.

Se observa que no existen diferencias apreciables en la cantidad de capsaicinoides extraídos con 1, 2 ó 3 ciclos de extracción de 5 minutos de duración, por lo que se optará por realizar las extracciones de capsaicinoides con 1 ciclo de extracción de 5 minutos a una temperatura de 200 °C y una presión de 100 atmósferas.

Re-extracciones.

Teniendo en cuenta los resultados de los distintos ciclos de extracción, aparentemente las extracciones fueron cuantitativas. Sin embargo, es necesario comprobarlo con la realización de re-extracciones. Para ello, se han realizado extracciones a 6 muestras mediante el método de extracción por EFP desarrollado: disolvente: metanol; temperatura: 200 °C; presión: 100 atm., cantidad de muestra: \approx 1 gramo; 1 ciclo de extracción estático de 5 minutos de duración. Estas muestras una vez extraídas mediante EFP, se han vuelto a extraer mediante este mismo método. Las recuperaciones de capsaicinoides observadas en las re-extracciones vienen recogidas en la tabla 36.

Capsaicinoide	<i>n-DHC</i>	<i>C</i>	<i>DHC</i>	<i>h-C</i>	<i>h-DHC</i>
1ª Extracción	91,2	432,9	262,0	29,3	46,8
1ª Re-extraccion	2,2	10,0	6,2	n.d.	1,5

Tabla 36: Rendimientos extracción y re-extracción ($\mu\text{mol/kg}$) de capsaicinoides con el método de PLE desarrollado. n.d.: no detectado.

Puede verse como se extraen cantidades de capsaicinoides inferiores al 5 % de los capsaicinoides extraídos con el método desarrollado previamente, por lo que se considera que las extracciones son cuantitativas.

Repetibilidad y reproducibilidad del método.

Se ha estudiado la repetibilidad y la reproducibilidad del método. Para ello se han realizado un total de 21 extracciones repartidas de la siguiente manera: 9 extracciones realizadas el primer día del estudio y 6 extracciones más en cada uno de los dos días siguientes. En la tabla 37 se observa como las DER fueron en ambos casos inferiores al 7 %.

	<i>n-DHC</i>	<i>C</i>	<i>DHC</i>	<i>h-C</i>	<i>h-DHC</i>
DER (%) repetibilidad	6,73	6,30	5,73	4,50	4,73
DER (%) reproducibilidad	6,18	5,92	5,67	6,08	4,51

Tabla 37: Repetibilidad (n=9) y reproducibilidad (n=18) del método desarrollado para los capsaicinoides analizados.

IV. 2. 2. 4. Conclusiones.

En este trabajo se ha desarrollado un método rápido, automatizado y cuantitativo de extracción de capsaicinoides a partir de muestras frescas de pimientos utilizando EFP, no observando degradación de estos compuestos en estas condiciones incluso a 200 °C. El método desarrollado presenta unas desviaciones estándares relativas para la repetibilidad y la reproducibilidad inferiores al 7 % para los 5 capsaicinoides analizados.

Los parámetros de extracción para capsaicinoides que se han resultado óptimos son los siguientes:

- **Disolventes:** metanol
- **Temperatura:** 200 °C
- **Presión:** 100 atmósferas
- **Cantidad de muestra:** \approx 1 gramo de pimientos frescos triturados
- **Ciclos de extracción estática:** 1 ciclo de 5 minutos de duración

IV. 2. 3. Extracción asistida por microondas de capsaicinoides en pimientos.

Resumen.

En este apartado se ha llevado a cabo el desarrollo de un método de extracción de capsaicinoides en pimientos mediante el empleo de la extracción asistida por microondas.

Los parámetros que se han estudiado son: disolvente de extracción (metanol, etanol, acetona, acetato de etilo y agua), temperatura (50-200°C), cantidad de muestra (0,1-1 gramo), volumen de disolvente (15-50 mL) y el tiempo de extracción (5-20 minutos). Las mejores condiciones han resultado ser: 125 °C como temperatura de extracción, 25 mL de disolvente, 0,5 gramos de pimientos frescos triturados y 5 minutos de extracción, empleando etanol 100 % como disolvente. Los capsaicinoides han resultado ser estables en las condiciones optimizadas de extracción. El método optimizado posee una alta reproducibilidad (DER < 6%).

IV. 2. 3. 1. Introducción.

La extracción asistida por microondas es una técnica de extracción que puede ser más eficaz que las técnicas convencionales de extracción de compuestos naturales²⁶⁶. Este hecho ha sido demostrado por la aplicación de esta técnica a un gran número de compuestos naturales procedentes de plantas y alimentos, como compuestos fenólicos de plantas²⁶⁷, pectinas en naranjas²⁶⁸, cafeína del te²⁶⁹, piperina de pimienta²⁷⁰, carotenoides del pimiento²⁷¹, aceites esenciales de hierbas aromáticas, etc., con excelentes resultados. Sin embargo, hay escasa información relativa a los capsaicinoides. Por todo ello, se plantea en este apartado el desarrollo de un método analítico de extracción de capsaicinoides en pimientos empleando la extracción asistida por microondas.

Durante el desarrollo del método se deberán evaluar diferentes disolventes de extracción, temperaturas, tiempos de extracción, volumen de disolvente, cantidad de muestra, así como establecer la repetibilidad y reproducibilidad del método. Al igual que en la EFP, el empleo de altas temperaturas por la EAM posee un especial atractivo, ya que como se ha mencionado anteriormente, la temperatura puede aumentar la eficacia de la extracción. Hay que tener en cuenta que es necesario el estudio de la estabilidad de los compuestos de interés, ya que estos compuestos pueden ser susceptibles de degradación. Por ello, para complementar el desarrollo del método, deberá realizarse, como primera

²⁶⁶ C.S. Eskilsson, E. Björklund. "Analytical-scale microwave-assisted extraction". Journal of Chromatography A, 902: 227-250, 2000.

²⁶⁷ D. Sterbová, D. Matejíček, J. Vlcek, V. Kubán. "Combined microwave-assisted isolation and solid-phase purification procedures prior to the chromatographic determination of phenolic compounds in plant materials". Analytica Chimica Acta, 513: 435-444, 2004.

²⁶⁸ M.L. Fishman, H.K. Chau, P. Hoagland, K. Ayyad. "Characterization of pectin, flash-extracted from orange albedo by microwave heating, under pressure". Carbohydrate Research, 323: 126-138, 2000.

²⁶⁹ X. Pan, G. Niu, H. Liu. "Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea". Chemical Engineering and Processing, 42: 129-133, 2003.

²⁷⁰ G. Raman, V.G. Gaikar. "Microwave-assisted extraction of piperine from *Piper nigrum*". Industrial & Engineering Chemistry Research, 41 (10): 2521-2528, 2002.

²⁷¹ G.A.C. Kiss, E. Forgács, T. Cserhádi, T. Mota, H. Morais, A. Ramos. "Optimisation of the microwave-assisted extraction of pigments from paprika (*Capsicum annum L.*) powders". Journal of Chromatography A, 889: 41-49, 2000.

etapa, la determinación de la estabilidad de los capsaicinoides mediante el empleo de la extracción asistida por microondas.

IV. 2. 3. 2. Materiales y métodos.

Muestra.

De igual manera que se hizo con la extracción asistida por ultrasonidos, y con la extracción mediante fluidos presurizados, se ha utilizado el pimiento picante cayena (*Capsicum frutescens*) para el desarrollo del método de extracción asistido por microondas con el mismo tratamiento previo ya comentado.

Durante el desarrollo del método se ha realizado el estudio de la estabilidad de los capsaicinoides a distintas temperaturas empleando un extracto estandarizado. Este extracto fue obtenido mediante extracción asistida por ultrasonidos de pimiento picante cayena que se ha utilizado para el estudio de la EAM. El disolvente que se empleó para la obtención de este extracto ha sido el metanol.

Procedimientos de extracción.

En la cámara de extracción se pesaba la cantidad de muestra de pimiento a extraer, y se añadía el volumen de disolvente que en cada extracción fuera a necesitarse. Una vez adicionado el disolvente se procedía a cerrar el vaso de extracción y se introducía en el extractor de microondas para aplicarle el método de extracción que correspondiese en cada caso. Una vez finalizado el método de extracción, se procedía al enfriamiento del vaso de extracción, para poder posteriormente abrirlo con seguridad. Una vez abierto, se adicionaba en el extracto 0,5 mL de patrón interno (≈ 1000 ppm de 2,5-dihidroxibenzaldehído) como corrector de volumen. Se tomaba una pequeña porción del extracto con una jeringuilla y se filtraba con un filtro de jeringa de nylon de 0,45 μm para el posterior análisis cromatográfico. Los parámetros de extracción que se han empleado han sido los siguientes:

a) La extracción de capsaicinoides a partir de muestras frescas de pimientos se llevó a cabo empleando diferentes condiciones de extracción:

Disolventes: metanol, etanol, acetona, acetato de etilo y agua

Temperatura: 50-200 °C

Potencia: 500 W

Volumen de disolvente: 15-50 mL

Cantidad de muestra: 0,1-1 gramo de pimiento picante cayena fresco

Tiempo de extracción: 5-20 minutos

Agitación magnética: 25 %

b) Para la determinación de la estabilidad de los capsaicinoides (nordihidrocapsaicina, capsaicina, dihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina) se ha empleado un extracto concentrado del pimiento picante cayena obtenido a partir del empleo de la extracción asistida por ultrasonidos. Las condiciones en las que se ha obtenido el extracto han sido las siguientes:

Disolvente: metanol

Temperatura: 50 °C

Tiempo: 10 minutos

El extracto obtenido de esta manera ha sido filtrado con un filtro de nylon de 0,45 µm para los posteriores análisis de estabilidad de los capsaicinoides a distintas temperaturas.

El proceso de degradación de los capsaicinoides presentes en el extracto de pimientos es similar al de una extracción normal, a diferencia de que se emplea 0.5 mL del extracto concentrado, en vez de la muestra real de pimientos picantes.

Cromatografía Líquida de Alta Eficacia.

Los análisis de los extractos de pimientos durante el estudio se llevaron a cabo empleando el método cromatográfico desarrollado en el apartado IV.1.2 para la columna monolítica Chromolith Performance RP-18e (100 mm x 4.6 mm).

IV. 2. 3. 3. Resultados y discusión.

Temperatura y estabilidad de capsaicinoides.

Como se ha comprobado en los apartados anteriores (EAU y EFP), la temperatura es un parámetro muy importante en la extracción de cualquier producto natural en general y de los capsaicinoides en particular. Una de las ventajas de la EAM es el empleo de altas temperaturas para aumentar y acelerar la eficacia de la extracción de los compuestos de interés de la muestra. En este apartado se pretende evaluar temperaturas comprendidas entre 50 y 200 °C (50, 100, 125, 150, 175 y 200°C). Por motivos prácticos, se planteó que la duración máxima del método de extracción a desarrollar debería ser de 30 minutos.

Por tales motivos, se plantea en un principio la realización del estudio de la estabilidad de los capsaicinoides presentes en un extracto previamente preparado. Para ello se ha sometido una mezcla de capsaicinoides, durante 30 minutos, a la acción de la radiación por microondas, a las distintas temperaturas anteriormente comentadas, para determinar si se produce degradación de los capsaicinoides. Esto permitirá seleccionar una temperatura de extracción máxima a la que se pueda plantear el proceso de extracción.

Se ha estudiado la estabilidad de los capsaicinoides con 0,5 mL de extracto de pimiento picante cayena concentrado, 24 mL de disolvente (metanol) y a una potencia de 500 W durante 30 minutos a las temperaturas anteriormente señaladas. Una vez

transcurridos los 30 minutos se adiciona 0,5 mL de patrón interno para la realización de la corrección de volumen.

La figura 50 presenta la concentración relativa de los distintos capsaicinoides presentes en los extractos sometidos a la radiación de microondas por un periodo de 30 minutos a temperaturas comprendidas entre 50 y 200 °C.

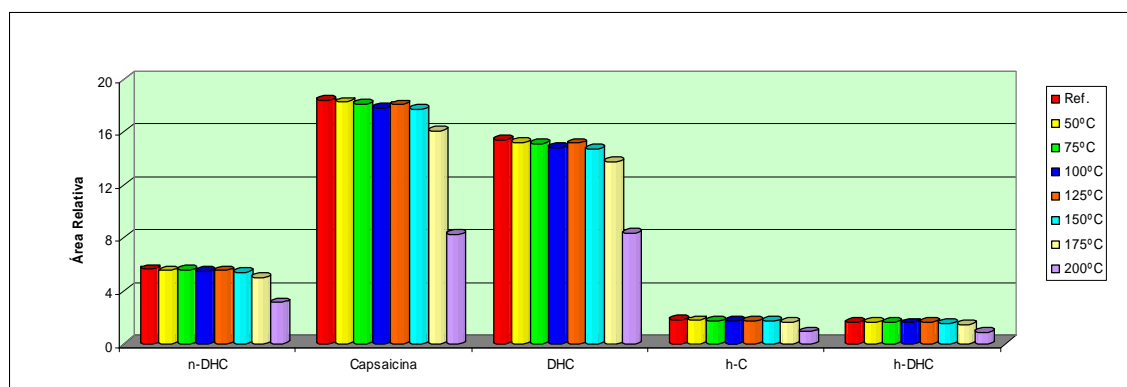


Figura 50: Recuperaciones de capsaicinoides a partir de disoluciones de patrones a diferentes temperaturas de extracción.

A la vista de la figura 50 se observa que en el transcurso de 30 minutos no se observa degradación de los capsaicinoides hasta una temperatura de 125 °C. A 150 °C empieza a observarse la degradación de los capsaicinoides, de hecho son tres compuestos los que presentan una diferencia significativa con la referencia, acentuándose esta degradación conforme se incrementa más la temperatura. Ya a 200 °C se observa una degradación muy acusada de todos los capsaicinoides presentes en el extracto.

Por todo ello, el desarrollo del método se realizó a 125 °C, para garantizar que no se fuera a producir una degradación de los compuestos de interés. En el apartado anterior se comprobó que empleando la extracción mediante fluidos presurizados, los capsaicinoides resultaron ser estables hasta temperaturas considerablemente mayores (200 °C). La única diferencia entre la EAM y la EFP es la mayor presencia de oxígeno en la primera, mientras que la segunda se desarrolla en atmósfera de nitrógeno. Se puede pensar por tanto, que son reacciones de oxidación las responsables de la degradación de los capsaicinoides.

Disolvente.

La selección del disolvente más adecuado a la hora de extraer los analitos de interés de la matriz de la muestra es un paso fundamental a la hora de desarrollar cualquier método de extracción. Por un lado tenemos que la efectividad de la EAM va a depender en gran parte de la capacidad que tenga el disolvente de extracción para absorber y transmitir la energía de los microondas. Además, los capsaicinoides deben de ser solubles en el disolvente que empleemos para la extracción.

Los disolventes que se han estudiado para extraer los capsaicinoides de la matriz de la muestra han sido el metanol, etanol, acetona, acetato de etilo y agua. El metanol y el

etanol, son disolventes que se emplean normalmente para la extracción de capsaicinoides en diversas técnicas de extracción, como pueden ser la extracción soxhlet, la maceración, o la extracción asistida por ultrasonidos. Con respecto a los trabajos anteriores de extracción mediante la EAU y la EFP, se han incluido en este estudio dos disolventes más como son el acetato de etilo y la acetona, por ser disolventes con polaridades y propiedades de absorción de la energía de los microondas distintas a las que pudieran tener el metanol o el etanol. El agua no es un buen disolvente a la hora de extraer capsaicinoides, pero se ha evaluado su capacidad de extracción de estos compuestos debido a que al ser un disolvente muy polar va a ser capaz de absorber una gran cantidad de energía de los microondas, lo cual puede facilitar el proceso de extracción de los capsaicinoides, ya que se alcanzan temperaturas altas más fácilmente.

Las extracciones se han realizado con una cantidad de pimiento picante cayena triturado en torno a 0,5 g de muestra, en 25 mL de disolvente, a una temperatura de 125 °C (500 W de potencia) durante 10 minutos de extracción y bajo agitación magnética al 25 %. Todos los ensayos se han realizado por triplicado.

En la figura 51 se representan las áreas relativas de los distintos capsaicinoides extraídos con los 5 disolventes estudiados.

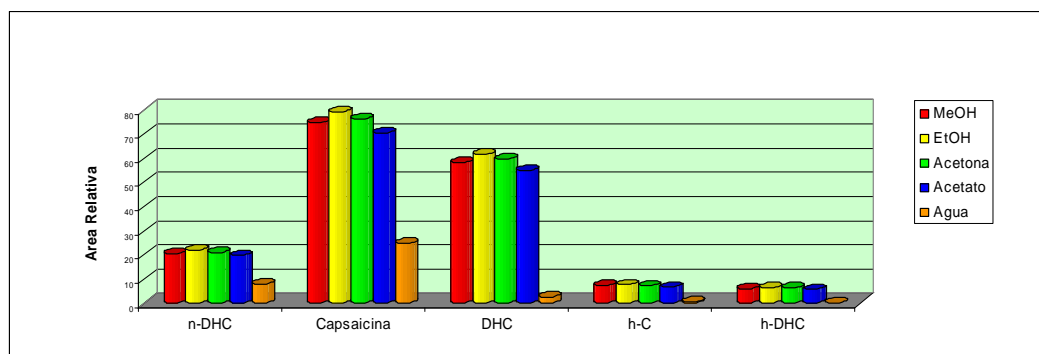


Figura 51: Recuperaciones de capsaicinoides a partir del pimiento picante cayena empleando diferentes disolvente puros.

A la vista de la gráfica, podemos observar que tanto el metanol, como el etanol y la acetona podrían emplearse con buenos resultados para la extracción de los capsaicinoides, aunque el etanol extrae una mayor cantidad de capsaicinoides. Por ello se decidió emplearlo, así como por su menor nivel de toxicidad.

En la gráfica también se observa que el agua, que es un disolvente muy polar, presenta una baja capacidad de extracción de capsaicinoides. Este efecto se acentúa a la hora de extraer los capsaicinoides menos polares como pueden ser la dihidrocapsaicina o la homodihidrocapsaicina, extrayendo un porcentaje mucho menor de estos capsaicinoides que de otros capsaicinoides más polares como la nordihidrocapsaicina o la capsaicina.

Por el mismo motivo que en el caso anterior se llevó a cabo el estudio de la adición de determinados porcentajes de agua (0, 10, 25 y 50 %) al etanol, como disolvente óptimo de extracción, para ver como se modifican las propiedades de extracción de este disolvente. Las condiciones de extracción han sido las mismas empleadas para la selección del

disolvente óptimo de extracción. De igual forma, todos los ensayos se han realizado por triplicado.

En la figura 52 se representan las cantidades relativas de capsaicinoides extraídas con etanol con distintos porcentajes de agua (0, 10, 25 y 50 %).

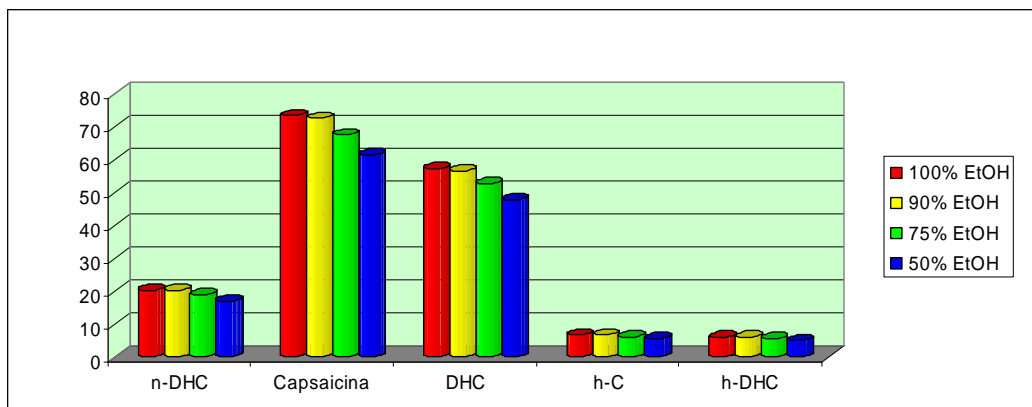


Figura 52: Recuperaciones de capsaicinoides a partir de pimienta picante Cayena empleando como disolventes diferentes mezclas etanol/agua.

Puede comprobarse que en el caso de los capsaicinoides, la adición de agua, al contrario de lo que ocurre con muchos compuestos, no mejora las propiedades extractantes del etanol, observándose que a medida que se incrementa el porcentaje de agua en el etanol, se produce una disminución de la cantidad de capsaicinoides extraídos. Esto puede ser debido a que la solubilidad de los capsaicinoides en el etanol disminuye a medida que incrementamos la polaridad del disolvente al adicionar agua.

Tiempo de extracción.

Para determinar el tiempo necesario para obtener extracciones completas, se realizaron extracciones de muestras de pimientos a distintos tiempos de extracción. Se han evaluado tiempos de extracción de 5, 10, 15 y 20 minutos. Todos los ensayos han sido llevados a cabo por triplicado.

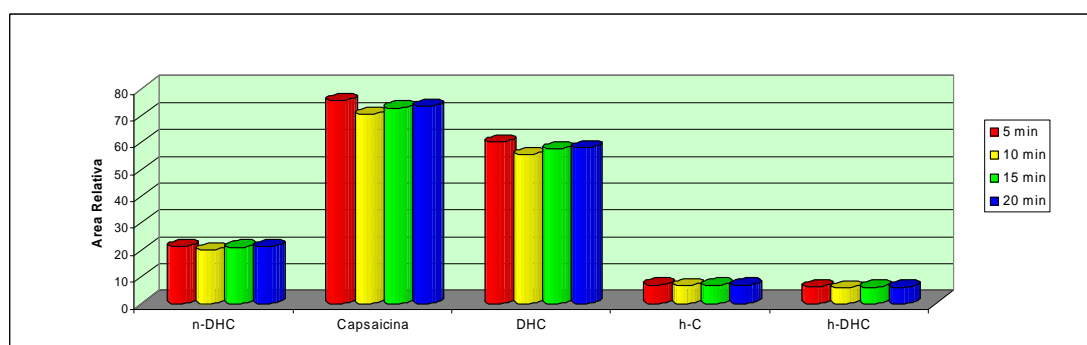


Figura 53: Recuperaciones relativas de capsaicinoides a partir del pimienta picante cayena empleando diferentes tiempos de extracción (5, 10, 15 y 20 minutos).

Como se puede comprobar en la figura 53, no se ha registrado un incremento claro de la recuperación de capsaicinoides con el incremento del tiempo de extracción. De hecho no hay diferencias apreciables entre las recuperaciones a distintos tiempos de extracción. Por ello, se emplearán 5 minutos de extracción, ya que este tiempo es suficiente para extraer los capsaicinoides presentes en muestras frescas de pimientos.

Volumen de disolvente.

Para las técnicas convencionales de extracción sólido-líquido, la tendencia es disminuir la relación masa/volumen de disolvente, en muchas ocasiones aumentando el volumen de extracción. En esta circunstancia, la mejora es debida a que hay un mayor volumen de disolvente para extraer la misma cantidad de soluto.

Para evaluar el efecto de esta variable, se han llevado a cabo una serie de extracciones con distintos volúmenes de disolvente (15, 25, 35 y 50 mL). Todos los ensayos se han realizado por triplicado.

En la figura 54 se representan las cantidades relativas de capsaicinoides extraídos con distintos volúmenes de disolventes.

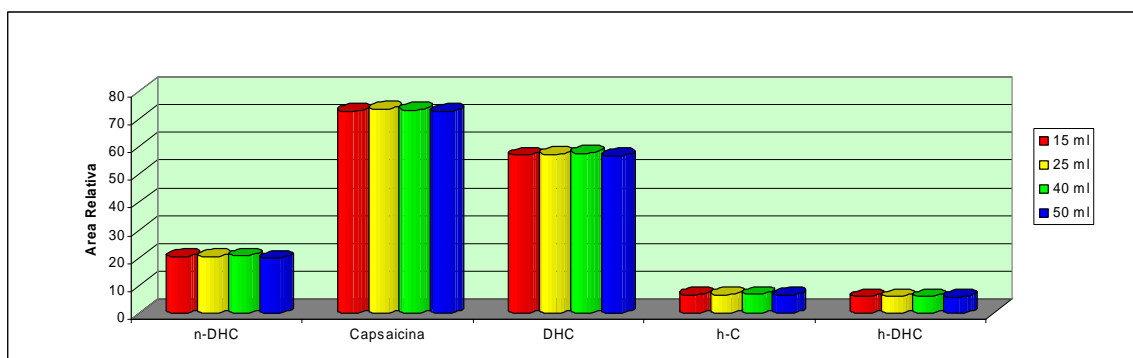


Figura 54: Recuperaciones relativas de capsaicinoides a partir del pimiento picante cayena empleando diferentes volúmenes de disolvente (15, 25, 35 y 50 mL).

Se observa que no hay diferencias apreciables al variar el volumen del disolvente de extracción. Por lo tanto, la variable volumen de disolvente no será un factor determinante a la hora de extraer capsaicinoides en estas condiciones. Se decidió trabajar con un volumen de 25 mL ya que de esta manera se obtienen picos cromatográficos de área adecuada para minimizar los errores de integración.

Cantidad de muestra.

Una vez optimizado el volumen de disolvente de extracción, se pasó a optimizar la cantidad de muestra que es el otro factor perteneciente a la relación masa/volumen de disolvente de la que se habló anteriormente.

En este trabajo se han estudiado cantidades de muestra de 0,1, 0,2, 0,5 y 1 gramos de pimientos, manteniendo el volumen constante en 25 mL de etanol. Todos los ensayos se han realizado por triplicado.

Los resultados obtenidos vienen recogidos en la figura 55.

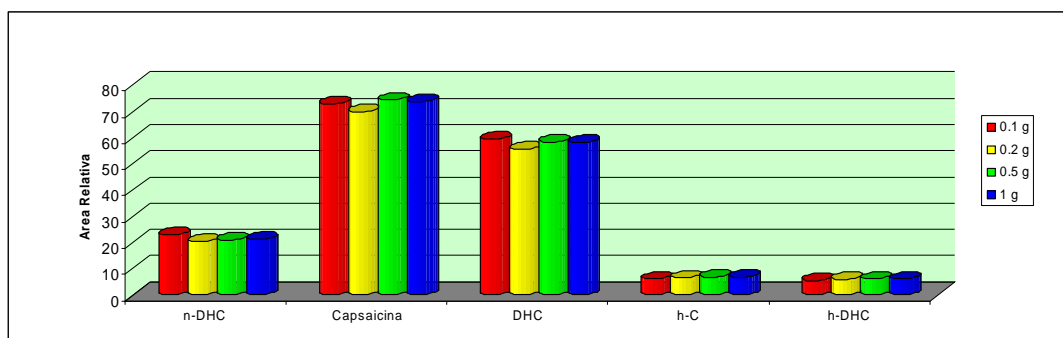


Figura 55: Recuperaciones relativas de capsaicinoides a partir del pimiento picante cayena empleando diferentes cantidades de muestra (0,1, 0,2, 0,5 y 1 gramos).

Se observa que la cantidad de muestra tampoco es un parámetro relevante. Así pues, se decidió emplear 0,5 gramos al ser una cantidad de muestra que produce picos cromatográficos de área suficiente para permitir integraciones fiables.

Repetibilidad y reproducibilidad del método.

A continuación se ha procedido a determinar la repetibilidad y la reproducibilidad del método desarrollado. Para ello se han realizado un total de 21 extracciones repartidas de la siguiente manera: 9 extracciones realizadas el primer día del estudio y 6 extracciones más en cada uno de los dos días siguientes.

Los resultados obtenidos expresados en tantos por ciento de desviación estándar relativa tanto para la repetibilidad como para la reproducibilidad vienen recogidos en la tabla 38.

	<i>n-DHC</i>	<i>C</i>	<i>DHC</i>	<i>h-C</i>	<i>h-DHC</i>
DER (%) repetibilidad	1,98	1,99	2,37	2,99	3,04
DER (%) reproducibilidad	4,06	4,84	5,28	5,92	5,53

Tabla 38: Repetibilidad ($n=9$) y reproducibilidad ($n=18$) del método desarrollado para los capsaicinoides analizados.

A la vista de la tabla 38 se observa que el error para la repetibilidad está en el 2-3 % mientras que el error para la reproducibilidad está sobre el 4-6 %, presentando por tanto valores similares al método desarrollado empleando la extracción mediante fluidos presurizados.

IV. 2. 3. 4. Conclusiones.

En este trabajo se ha desarrollado un método rápido y cuantitativo de extracción de capsaicinoides a partir de muestras frescas de pimientos utilizando la extracción asistida por microondas, no observando degradación de estos compuestos hasta 125 °C. El método desarrollado posee una desviación estandar relativa para la repetibilidad de un máximo del 3,04 % y reproducibilidad inferior al 6 %.

Los parámetros de extracción para capsaicinoides que se han desarrollado son los siguientes:

- **Temperatura:** 125 °C
- **Disolvente:** etanol 100%
- **Tiempo:** 5 minutos de extracción
- **Volumen de disolvente:** 25 mL
- **Cantidad de muestra:** \approx 0.5 gramos de pimiento fresco triturado
- **Agitación magnética:** 25 %

IV. 2. 4. Estudio comparativo entre los métodos de extracción desarrollados.

Resumen.

Este apartado de la parte experimental se centró en la comparación entre los tres métodos de extracción de capsaicinoides en muestras frescas de pimientos desarrollados:

- **Extracción asistida por ultrasonidos (EAU).**
- **Extracción mediante fluidos presurizados (EFP).**
- **Extracción asistida por microondas (EAM).**

Los parámetros que se han comparado son la temperatura, la presión, el disolvente y volumen del mismo, el tiempo de extracción, el número de muestras simultáneas que se pueden extraer a la vez, el tiempo del operario, tiempo del operario por análisis, la posibilidad de automatización, las etapas adicionales que requieren los métodos, la reproducibilidad del método, el coste del equipo y la dificultad en el manejo de los mismos.

IV. 2. 4. 1. Comparación de los métodos de extracción desarrollados.

En la tabla 39 se reúnen las características de los métodos de extracción desarrollados para la extracción de capsaicinoides en pimientos.

PARÁMETRO DE EXTRACCIÓN	EAU	EFP	EAM
Temperatura	50 °C	200 °C	125 °C
Presión (atm.)	-	100	2-4
Disolvente	metanol	metanol	etanol
Volumen de disolvente	25 mL	≈ 20 mL	25 mL
Tiempo extracción (min.)	10	5	5
Número de muestras simultáneas	12	1	9
Tiempo del operario total (min.)	≈ 45	≈ 30	≈ 110
Tiempo operario/muestra (min.)	≈ 4	≈ 30	≈ 12
Posibilidad de automatización	no	si	no
Etapas adicionales	Filtrado/Adición de P.I.	Filtrado / Enrasado	Filtrado/Adición de P.I.
Reproducibilidad	< 3 %	< 7 %	< 6 %
Coste del equipo (€)	1000	60000	35000
Formación necesaria del operario	baja	alta	alta

Tabla 39: Resumen de las características de los métodos de extracción desarrollados.(P.I.:Patrón Interno).

Como puede observarse de la tabla 39, los métodos desarrollados presentan ventajas y desventajas entre ellos, con lo que no hay uno claramente superior a los otros. La extracción asistida por ultrasonidos y la extracción asistida por microondas presentan algunas ventajas con relación a la extracción por fluidos presurizados, como puede ser la posibilidad de realizar varias extracciones simultáneas, siendo dos métodos muy similares.

Respecto a la temperatura de extracción, la EFP es la que trabaja a mayor temperatura (200 °C) seguida de la EAM (125 °C), lo que hace que estas dos técnicas tengan la capacidad de extraer más rápidamente los capsaicinoides (5 minutos de tiempo de extracción frente a 10 minutos de extracción que se requieren en la EAU). Un menor

tiempo de extracción facilita mucho el análisis de una gran cantidad de muestras, además de ahorrar energía y tiempo de trabajo.

Respecto a la presión de la extracción, la EAU se realiza en vaso abierto, mientras que la EFP y la EAM se realizan en cámaras de extracción cerradas, aunque es la EFP la técnica de extracción que puede llegar a una mayor presión (100 atmósferas).

Respecto al disolvente utilizado, la EAU y la EFP presentan como mejor disolvente de extracción de capsaicinoides a partir de muestras frescas de pimientos al metanol, mientras que el mejor disolvente para la EAM es el etanol. De todas formas, la cantidad de capsaicinoides que se extraen con estos dos disolventes en estas tres técnicas de extracción desarrolladas son muy similares. Los volúmenes de disolventes que se consumen en el proceso de extracción son muy similares en estas tres técnicas (≈ 25 mL).

Como se ha comentado anteriormente, una de las ventajas que presentan la EAU y la EAM con respecto a la EFP es que estas dos técnicas permiten realizar varias extracciones simultáneamente. Por ejemplo, en los equipos disponibles en nuestro grupo de investigación, podemos realizar 12 extracciones simultáneas empleando la EAU y 9 extracciones simultáneas empleando la EAM. La EFP solo es capaz de realizar una extracción a la vez, pero presenta una ventaja con respecto a las otras dos técnicas, y es la posibilidad de automatizar el proceso de extracción, pudiendo programar el equipo para que realice consecutivamente hasta 24 extracciones sin necesidad de la presencia del operario.

Desde un punto de vista práctico, lo que en verdad interesa es el tiempo real total de la extracción. De esta manera un operario podría extraer completamente unas 12 muestras de pimientos empleando la EAU en unos 45 minutos de tiempo, si contamos el tiempo de pesada de las muestras, de enfriamiento y de filtrado de las mismas. Este mismo operario tardaría en torno a 110 minutos en extraer 9 muestras empleando la EAM, si contamos el tiempo de pesada, sellado del vaso de extracción, extracción, enfriamiento del vaso y filtración del extracto. Respecto a la EFP solo podremos realizar una extracción a la vez, pero presenta la ventaja de ser un método automático. De esta manera obtenemos finalmente que de promedio, en obtener un extracto mediante EAU se tarda en torno a 4 minutos, mediante EAM en torno a 12 minutos y mediante EFP sobre 30 minutos. A la vista de estos datos la EAU parece ser la técnica más adecuada a la hora de extraer un mayor número de muestras frescas de pimientos, ya que es la que presenta un menor tiempo de análisis por muestra.

La EAU es además la técnica que presenta mejores valores para la reproducibilidad del método, llegando a tener errores inferiores al 3 % para todos los capsaicinoides estudiados. La EFP y la EAM presentan valores algo mayores en el error del método, siendo estos errores inferiores al 7 y al 6 % respectivamente.

Además debemos de tener en cuenta el coste de los equipamientos y la dificultad de manejo de los mismos. Tanto la EFP como la EAM son técnicas que requieren de unos equipamientos muy costosos, que no son viables en todos los laboratorios de análisis. Además de ello, el manejo de estos equipos no es sencillo, lo que requiere de personal cualificado a la hora de realizar este tipo de análisis. Por el contrario, la EAU es una técnica que requiere un equipamiento muy económico, capaz de estar presente en la mayoría de los laboratorios de análisis. Además la EAU es una técnica muy sencilla de

realizar, que no necesitaría en principio de personal altamente cualificado para llevar a cabo esta metodología de extracción.

Otro aspecto importante para la elección del método de extracción más adecuado es el tipo de muestras a analizar. Para el procesado de un mismo tipo de muestras, como el pimiento fresco, y utilizando siempre el mismo método de extracción, se puede llevar a cabo fácilmente empleando el protocolo de extracción optimizado para los ultrasonidos. Por el contrario, para diferentes tipos de muestras, o si tenemos pocas muestras y tenemos que ir modificando las variables de extracción, lo ideal sería emplear la EFP, ya que es una técnica automatizable, que se puede dejar programada por el operario. Además para el caso de distintas muestras, lo ideal sería emplear el sistema de re-extracciones para determinar la cantidad total de compuestos en nuestra muestra. En este caso, la facilidad que presentan los extractores de fluidos presurizados a la hora de realizar re-extracciones de las muestras, aconsejan su uso.

La posibilidad de automatización, el no necesitar etapas posteriores de purificación de las muestras y la facilidad de procesado de las mismas, pueden ser factores decisivos para la elección de un método de extracción. Estas ventajas implican un menor tiempo de laboratorio y consecuentemente un ahorro en horas de trabajo del personal encargado. La EFP es una técnica que presenta estas ventajas aquí expuestas, y posee además el menor tiempo total de análisis del operario.

IV. 2. 4. 2. Conclusiones.

Por lo que se ha expuesto anteriormente, la elección del mejor método de extracción depende principalmente de los objetivos y de las condiciones que se tienen para alcanzarlos.

Por ejemplo, si el objetivo es analizar un gran número de muestras en poco tiempo, no necesitando modificar el método de extracción, con disponibilidad suficiente de mano de obra y con una pequeña inversión de capital en equipos, la EAU es la técnica de extracción más adecuada a la hora de realizar los análisis de capsaicinoides en pimientos.

Si el problema es la mano de obra, se puede invertir un mayor capital en adquisición de equipos y tenemos una mayor heterogeneidad en las muestras o en los métodos de extracción a emplear, posiblemente la EFP sea la mejor elección a la hora de extraer los capsaicinoides, puesto que además permite realizar re-extracciones automatizadas.

Respecto a la EAM, que en principio parecía ser una de las mejores opciones, acaba quedando en un segundo plano. Aunque el extractor asistido por microondas tiene un coste algo menor al de un extractor por fluidos presurizados, sin embargo no permite la re-extracción automatizada de muestras, necesitando además una disponibilidad de mano de obra similar o incluso superior a la de los equipos de ultrasonidos. De todas formas es una técnica también muy eficaz de extracción de capsaicinoides presentando ventajas intermedias entre la EAU y la EFP, por lo que puede considerarse una tercera opción a la hora de extraer capsaicinoides presentándose como una alternativa a las otras dos técnicas.

IV. 3. SÍNTESIS DE CAPSAICINOIDES Y CAPSINOIDES. ESTUDIO DE LA RELACIÓN CUANTITATIVA ESTRUCTURA-ACTIVIDAD (QSAR).

En este capítulo del trabajo se ha abordado la síntesis de capsaicinoides y capsinoides, para la elaboración de una serie de análogos sintéticos de capsaicinoides y capsinoides con distintas longitudes de cadena para ver cuales de estos análogos poseen propiedades biológicas similares a los capsaicinoides y capsinoides naturales. Para ello se han realizado ensayos biológicos a los productos sintetizados para comparar sus propiedades biológicas con las de los productos naturales que aparecen en la naturaleza. Por tanto, este capítulo del trabajo se ha dividido en las siguientes partes:

- Síntesis de capsaicinoides para la obtención de capsaicinoides con distintas longitudes de cadena (distinta lipofilia).
- Desarrollo de un nuevo procedimiento de síntesis de capsinoides y síntesis de capsinoides con distinta longitud de cadena.
- Desarrollo de métodos cromatográficos para la separación de los capsaicinoides y capsinoides sintetizados.
- Realización de ensayos biológicos con los capsinoides y capsaicinoides sintetizados para determinar qué compuestos de los sintetizados poseen propiedades biológicas similares a los naturales.

En este capítulo se pretende por tanto obtener capsinoides y capsaicinoides con propiedades biológicas similares a los naturales, pero cuya síntesis sea más sencilla y económica.

IV. 3. 1. Síntesis de capsaicinoides.

IV. 3. 1. 1. Introducción.

El objetivo de este apartado del trabajo es llevar a cabo la síntesis de una serie de análogos de los capsaicinoides naturales, presentando éstos distintas longitudes de cadena, o lo que sería lo mismo decir, distinta lipofilia. Al tener capsaicinoides con distinta lipofilia, se puede posteriormente determinar, mediante bioensayos, cuales son los capsaicinoides que presentan mejores propiedades biológicas. Esto permitirá evaluar mediante bioensayos la relación entre la lipofilia y la actividad mostrada por estos compuestos.

Por lo tanto, se ha llevado a cabo la síntesis de una serie de análogos a los capsaicinoides naturales de distinta longitud de cadena (C2-C16). En total se han sintetizado 14 capsaicinoides que cubren un amplio rango de valores de lipofilia ($0,94 < \text{IALog P} < 7,45$). Los capsaicinoides naturales mayoritarios (capsaicina y dihidrocapsaicina) tienen unos valores de IALog P de 3,87 y 4,33 respectivamente.

Los valores de IALogP son valores teóricos que dan una idea muy aproximada sobre la lipofilia que presentan los compuestos y son calculados a partir de programas informáticos. Estos valores son ampliamente utilizados para el diseño y síntesis de nuevas moléculas dentro de un rango óptimo de lipofilia.

Ya se comentó en el apartado I.6. que existen distintas metodologías de síntesis de capsaicinoides, las cuales se englobaban en síntesis química y síntesis enzimática. Se ha empleado la síntesis de capsaicinoides propuesta por McIlvain y colaboradores²⁷² para la síntesis de la capsaicina (la cual viene recogida en la patente WO 2004/092122 A2).

A continuación se pasará a exponer la síntesis de los 14 capsaicinoides sintetizados. Como abreviatura a la nomenclatura de los capsaicinoides, se ha propuesto nombrar a los compuestos sintetizados de esta familia mediante la siguiente forma: Nx C. En esta fórmula abreviada, N representa al nitrógeno característico de esta familia de compuestos, por formar el enlace amida que poseen los capsaicinoides; xC va a representar el número de carbonos de la cadena lateral que se introduzca para formar cada capsaicinoide. Por lo tanto, el compuesto que se nombre como N10C, será aquel capsaicinoide que posea en su cadena lateral lineal 10 átomos de carbono.

²⁷² S. McIlvain, W. Chen, P. Ramiya, R. Burch, R. Carter, T. Anderson. "Preparation and Purification of synthetic capsaicin". Patente: WO 2004/092122 A2.

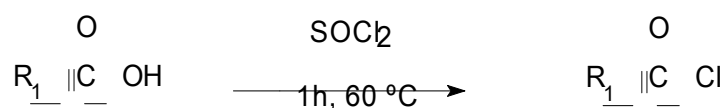
IV. 3. 1. 2. Metodología de síntesis de capsaicinoides.

Como se ha comentado anteriormente se ha seguido la metodología sintética empleada por McIlvain y colaboradores empleando alguna pequeña modificación. La metodología de síntesis empleada se comenta a continuación.

➤ Formación de cloruros de acilo a partir de sus ácidos correspondientes

Algunos ácidos (ácido undecanoico y ácido tridecanoico) han sido transformados en sus correspondientes cloruros de acilo para realizar posteriormente las acilaciones del clorhidrato de la 4-hidroxi-3-metoxi-bencilamina (esquema de reacción 1).

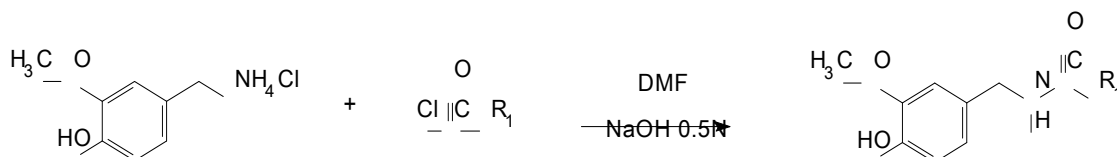
Los ácidos se introducen en un matraz de 50 mL de fondo redondo. Se introduce atmósfera inerte de argón. Bajo agitación magnética se adiciona muy lentamente, gota a gota, desde una jeringa una cantidad de cloruro de tionilo suficiente para disolver el ácido. Una vez adicionado el cloruro de tionilo, la mezcla de reacción se calienta a 60 °C durante 1 hora. Posteriormente se elimina el cloruro de tionilo en exceso directamente a presión reducida en el rotavapor (20 °C), obteniéndose un aceite transparente. El cloruro de acilo formado se disuelve en una cantidad conocida de tetrahidrofurano anhidro para ser utilizado en las posteriores acilaciones del clorhidrato de la 4-hidroxi-3-metoxi-bencilamina.



Esquema de reacción 1: *Formación de cloruros de acilo a partir de sus ácidos correspondientes.*

➤ Acilación del clorhidrato de la 4-hidroxi-3-metoxi-bencilamina con cloruros de acilo.

Para la formación de los capsaicinoides se han realizado acilaciones del clorhidrato de la 4-hidroxi-3-metoxi-bencilamina con los cloruros de acilo correspondientes, según el capsaicinoide que se quisiera sintetizar. Para ello se ha operado de la siguiente manera (esquema de reacción 2):



Esquema de reacción 2: *Acilación del clorhidrato de la 4-hidroxi-3-metoxi-bencilamina con cloruros de acilo.*

El clorhidrato de la 4-hidroxi-3-metoxi-bencilamina (0,5-1 g) se introduce en un matraz de fondo redondo de 250 mL y se disuelve en 15 mL de N,N-dimetilformamida (DMF). Se introduce atmósfera inerte de argón y se mantiene bajo agitación magnética hasta que todo el producto de partida se disuelve. Posteriormente se adiciona 1 mL de NaOH 5N lentamente, gota a gota, en baño de hielo. Una vez adicionado el NaOH, se retira el baño de hielo y se deja la mezcla en agitación a temperatura ambiente durante 60 minutos. Posteriormente se adicionan los cloruros de acilo de las cadenas carbonadas que se deseen introducir (2,5 equivalentes), disueltos en 2 mL de tetrahidrofurano anhidro desde una jeringa, lentamente y en baño de hielo. Una vez adicionado el cloruro de acilo se deja la mezcla de reacción en agitación magnética y bajo atmósfera inerte de argón a temperatura ambiente durante 18 horas. La reacción se sigue por CCF (eluyente: 1 % de metanol en cloroformo; revelador: óleum).

Una vez terminada la reacción, se detiene con agua (50-100 mL). La fase acuosa se extrae tres veces con acetato de etilo (3x100 mL). Se reúnen las tres fases orgánicas. Posteriormente se lava la fase orgánica 2 veces con HCl 1N (2x150 mL). Seguidamente se lava la fase orgánica 2 veces con NaHCO₃ saturada (2x150 mL). En estos tres pasos se desecha la fase acuosa. Finalmente se lava la fase orgánica una vez con salmuera (1x150 mL). La fase orgánica se seca con MgSO₄ anhidro, se filtra y se concentra a vacío en el rotavapor a 40 °C obteniéndose un aceite rosáceo impuro.

Una vez obtenido este aceite rosáceo, se realizó una cromatografía en columna para purificar el producto final. La cromatografía en columna fue llevada a cabo con sílica gel y la polaridad del eluyente es del 1 % de metanol en cloroformo. La columna se sigue por CCF (eluyente: 1 % de metanol en cloroformo; revelador: oleum). El producto final eluido se concentra a vacío en el rotavapor a 40 °C y se obtiene finalmente un cristal blanquecino, que corresponde con los capsaicinoides sintetizados.

La numeración que se seguirá para las asignaciones de ¹H-RMN y ¹³C-RMN de los capsaicinoides sintetizados se muestra en la figura 56 (ej. producto N16C).

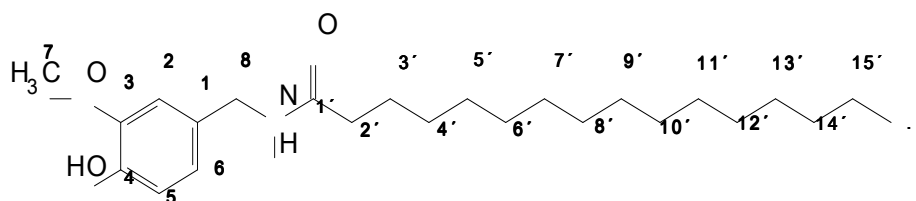


Figura 56: Numeración utilizada en las asignaciones de ¹H-RMN y ¹³C-RMN de los capsaicinoides sintetizados.

Los capsaicinoides sintetizados así como los rendimientos obtenidos vienen recogidos en la tabla 40.

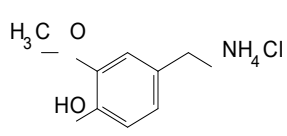
Compuesto inicial	R ₁	Abrev. Producto	Rendimiento
	-CH ₃	N2C	48.35 %
	-CH ₂ CH ₃	N3C	55.86 %
	-(CH ₂) ₂ CH ₃	N4C	60.79 %
	-(CH ₂) ₃ CH ₃	N5C	56.42 %
	-(CH ₂) ₄ CH ₃	N6C	61.24 %
	-(CH ₂) ₅ CH ₃	N7C	58.97 %
	-(CH ₂) ₆ CH ₃	N8C	57.60 %
	-(CH ₂) ₇ CH ₃	N9C	60.51 %
	-(CH ₂) ₈ CH ₃	N10C	62.92 %
	-(CH ₂) ₉ CH ₃	N11C	58.54 %
	-(CH ₂) ₁₀ CH ₃	N12C	61.25 %
	-(CH ₂) ₁₁ CH ₃	N13C	57.10 %
	-(CH ₂) ₁₂ CH ₃	N14C	62.48 %
	-(CH ₂) ₁₄ CH ₃	N16C	60.36 %
	-(CH ₂) ₆ CH(CH ₃) ₂	Dihidrocapsaicina	Comercial
	-(CH ₂) ₄ CH=CHCH(CH ₃) ₂	Capsaicina	Comercial

Tabla 40: Capsaicinoides y rendimientos obtenidos.

Las nomenclaturas químicas de los productos sintetizados en este paso de reacción son las siguientes:

- N2C:** N-(4-hidroxi-3-metoxibencil) acetamida.
N3C: N-(4-hidroxi-3-metoxibencil) propanamida.
N4C: N-(4-hidroxi-3-metoxibencil) butanamida.
N5C: N-(4-hidroxi-3-metoxibencil) pentanamida.
N6C: N-(4-hidroxi-3-metoxibencil) hexanamida.
N7C: N-(4-hidroxi-3-metoxibencil) heptanamida.
N8C: N-(4-hidroxi-3-metoxibencil) octanamida.
N9C: N-(4-hidroxi-3-metoxibencil) nonamida.
N10C: N-(4-hidroxi-3-metoxibencil) decanamida.
N11C: N-(4-hidroxi-3-metoxibencil) undecanamida.
N12C: N-(4-hidroxi-3-metoxibencil) dodecanamida.
N13C: N-(4-hidroxi-3-metoxibencil) tridecanamida.
N14C: N-(4-hidroxi-3-metoxibencil) tetradecanamida.
N16C: N-(4-hidroxi-3-metoxibencil) hexadecanamida.

➤ **Asignaciones de protón ^1H -RMN y constantes de acoplamiento (J) de los capsaicinoides sintetizados.**

Como se ha comentado, se han sintetizado 14 capsaicinoides de la manera anteriormente descrita. La determinación de la identidad del producto de reacción se ha realizado mediante resonancia magnética nuclear. A continuación se presentan las asignaciones de protón (δ), expresadas en ppm, y las multiplicidades de los protones de los 14 capsaicinoides sintetizados (tablas 41, 42, 43 y 44).

Los espectros de protón (^1H -RMN) han sido llevados a cabo en un equipo Varian (INOVA-400), utilizando como disolvente cloroformo deuterado. Los desplazamientos químicos se indican en unidades δ (ppm) y las constantes de acoplamiento en hertzios (Hz). Los valores de δ están referenciados respecto del pico residual del cloroformo a δ de 7,25 ppm.

H	N2C		N3C		N4C		N5C	
	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.
2	6.86	d	6.79	d	6.74	d	6.68	d
6	6.85	dd	6.74	dd	6.68	dd	6.62	dd
5	6.88	d	6.84	d	6.80	d	6.74	d
OH	5.79	s	5.71	s	6.19	s	-	s
NH	6.42	t	6.34	t	6.10	t	6.51	t
7	3.87	s	3.86	s	3.79	s	3.71	s
8	4.32	s	4.33	d	4.28	d	4.22	d
2'	2.07	s	2.22	c	2.14	t	2.13	t
3'			1.16	t	1.63	tc	1.54	q
4'					0.90	t	1.25	tc
5'							0.82	t

Tabla 41: Asignaciones de protón ^1H -RMN (ppm) y multiplicidades de los protones pertenecientes a los capsaicinoides N2C, N3C, N4C y N5C.

H	N6C		N7C		N8C		N9C	
	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.
2	6.71	d	6.69	d	6.68	d	6.75	d
6	6.65	dd	6.62	dd	6.62	dd	6.70	dd
5	6.77	d	6.74	d	6.73	d	6.81	d
OH	6.43	s	6.55	s	-	s	6.04	s
NH	6.34	t	6.55	t	6.54	t	5.98	t
7	3.75	s	3.72	s	3.71	s	3.81	s

8	4.25	d	4.22	d	4.22	d	4.29	d
2'	2.14	t	2.24	t	2.14	t	2.16	t
3'	1.57	q	1.55	q	1.54	q	1.60	q
4'	1.23	m	1.18	m	1.15-1.25	m	1.18-1.29	m
5'	1.23	m	1.18	m	1.15-1.25	m	1.18-1.29	m
6'	0.82	t	1.18	m	1.15-1.25	m	1.18-1.29	m
7'			0.79	t	1.15-1.25	m	1.18-1.29	m
8'					0.79	t	1.18-1.29	m
9'							0.84	t

Tabla 42: Asignaciones de protón ^1H -RMN (ppm) y multiplicidades de los protones pertenecientes a los capsaicinoides N6C, N7C, N8C y N9C.

H	N10C		N11C		N12C		N13C	
	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.
2	6.72	d	6.72	d	6.70	d	6.77	d
6	6.65	dd	6.65	dd	6.64	dd	6.71	dd
5	6.77	d	6.77	d	6.76	d	6.82	d
OH	6.17	s	6.37	s	6.50	s	-	s
NH	6.34	t	6.27	t	6.40	t	5.94	t
7	3.77	s	3.76	s	3.74	s	3.83	s
8	4.26	d	4.25	d	4.23	d	4.31	d
2'	2.16	t	2.14	t	2.14	t	2.18	t
3'	1.57	q	1.58	q	1.57	q	1.60	q
4'	1.17-1.30	m	1.16-1.30	m	1.16-1.28	m	1.22-1.32	m
5'	1.17-1.30	m	1.16-1.30	m	1.16-1.28	m	1.22-1.32	m
6'	1.17-1.30	m	1.16-1.30	m	1.16-1.28	m	1.22-1.32	m
7'	1.17-1.30	m	1.16-1.30	m	1.16-1.28	m	1.22-1.32	m
8'	1.17-1.30	m	1.16-1.30	m	1.16-1.28	m	1.22-1.32	m
9'	1.17-1.30	m	1.16-1.30	m	1.16-1.28	m	1.22-1.32	m
10'	0.83	t	1.16-1.30	m	1.16-1.28	m	1.22-1.32	m
11'			0.83	t	1.16-1.28	m	1.22-1.32	m
12'					0.87	t	1.22-1.32	m
13'							0.86	t

Tabla 43: Asignaciones de protón ^1H -RMN (ppm) y multiplicidades de los protones pertenecientes a los capsaicinoides N10C, N11C, N12C y N13C.

H	N14C		N16C	
	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.
2	6.77	d	6.77	d
6	6.70	dd	6.71	dd
5	6.80	d	6.82	d
OH	-	s	-	s
NH	6.06	t	5.97	t
7	3.81	s	3.83	s
8	4.30	d	4.31	d
2'	2.18	t	2.18	t
3'	1.60	q	1.60	q
4'	1.21-1.32	m	1.21-1.32	m
5'	1.21-1.32	m	1.21-1.32	m
6'	1.21-1.32	m	1.21-1.32	m
7'	1.21-1.32	m	1.21-1.32	m
8'	1.21-1.32	m	1.21-1.32	m
9'	1.21-1.32	m	1.21-1.32	m
10'	1.21-1.32	m	1.21-1.32	m
11'	1.21-1.32	m	1.21-1.32	m
12'	1.21-1.32	m	1.21-1.32	m
13'	1.21-1.32	m	1.21-1.32	m
14'	0.85	t	1.21-1.32	m
15'			1.21-1.32	m
16'			0.86	t

Tabla 44: Asignaciones de protón ^1H -RMN (ppm) y multiplicidades de los protones pertenecientes a los capsaicinoides N14C y N16C.

Las constantes de acoplamiento (J) de los protones, expresadas en hertzios (Hz), para cada capsaicinoide sintetizado se exponen a continuación:

N2C: J(Hz): 3,5= 1.8; 5,6= 6.5; 8,NH= 5.6

N3C: J(Hz): 3,5= 1.8; 5,6= 8.1; 8,NH= 5.6; 2',3'= 7.6

N4C: J(Hz): 3,5= 1.8; 5,6= 7.9; 8,NH= 5.6; 2',3'= 7.6; 3',4'= 7.6

N5C: J(Hz): 3,5= 1.8; 5,6= 8.0; 8,NH= 5.6; 2',3'= 7.6; 3',4'= 7.6; 4',5'= 7.4

N6C: J(Hz): 3,5= 1.8; 5,6= 7.9; 8,NH= 5.6; 2',3'= 7.6; 3',4'= 7.6; 4',5'= 7.2; 5',6'= 6.8

N7C: J(Hz): 3,5= 1.8; 5,6= 7.9; 8,NH= 5.6; 2',3'= 7.6; 3',4'= 7.2; 6',7'= 7.0

N8C: J(Hz): 3,5= 1.8; 5,6= 7.9; 8,NH= 5.6; 2',3'= 7.6; 3',4'= 6.8; 7',8'= 6.8

N9C: J(Hz): 3,5= 1.8; 5,6= 8.2; 8,NH= 5.6; 2',3'= 7.6; 3',4'= 7.4; 8',9'= 7

N10C: J(Hz): 3,5= 1.8; 5,6= 7.9; 8,NH= 5.6; 2',3'= 7.6; 3',4'= 7.2; 9',10'= 6.8

N11C: J(Hz): 3,5= 1.8; 5,6= 8.2; 8,NH= 5.6; 2',3'= 7.6; 3',4'= 7.2; 10',11'= 7.0

N12C: J(Hz): 3,5= 1.8; 5,6= 8.2; 8,NH= 5.6; 2',3'= 7.6; 3',4'= 7.2; 11',12'= 6.8

N13C: J(Hz): 3,5= 1.8; 5,6= 7.9; 8,NH= 5.6; 2',3'= 7.6; 3',4'= 7.2; 12',13'= 6.8

N14C: J(Hz): 3,5= 1.8; 5,6= 8.2; 8,NH= 5.6; 2',3'= 7.6; 3',4'= 7.2; 13',14'= 6.8

N16C: J(Hz): 3,5= 1.8; 5,6= 8.2; 8,NH= 5.6; 2',3'= 7.6; 3',4'= 7.2; 15',16'= 7.0

➤ Asignaciones de carbono ^{13}C -RMN de los capsaicinoides sintetizados

Los espectros de carbono (^{13}C -RMN) han sido llevados a cabo en un equipo Varian (INOVA-400), utilizando como disolvente cloroformo deuterado. Los desplazamientos químicos se indican en unidades δ (ppm) referenciados respecto del pico central del cloroformo a δ de 77,0 ppm. Las asignaciones de carbono (δ) y sus multiplicidades, de los 14 capsaicinoides sintetizados, vienen recogidas a continuación (tablas 45, 46, 47 y 48).

C	N2C		N3C		N4C		N5C	
	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.
4	145.8	s	145.1	s	145.1	s	144.9	s
3	146.5	s	146.7	s	146.7	s	146.7	s
2	111.3	d	110.7	d	110.7	d	110.6	d
1	127.7	s	130.3	s	130.1	s	129.9	s
6	122.0	d	120.8	d	120.5	d	120.2	d
5	114.3	d	114.4	d	114.4	d	114.4	d
7	55.9	c	55.9	c	55.7	c	55.5	c
8	43.6	t	43.5	t	43.3	t	43.1	t
1'	173.2	s	173.5	s	173.0	s	173.3	s
2'	21.0	c	29.7	t	38.5	t	36.1	t
3'			9.8	c	19.1	t	27.6	t
4'					13.6	c	22.1	t
5'							13.5	c

Tabla 45: Asignaciones de carbono ^{13}C -RMN (ppm) y multiplicidades de los carbonos pertenecientes a los capsaicinoides N2C, N3C, N4C y N5C.

C	N6C		N7C		N8C		N9C	
	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.
4	145.0	s	145.0	s	144.9	s	145.1	s
3	146.7	s	146.7	s	146.7	s	146.7	s
2	110.6	d	110.6	d	110.6	d	110.7	d
1	130.0	s	129.9	s	129.9	s	130.2	s
6	120.4	d	120.2	d	120.1	d	120.6	d
5	114.4	d	114.4	d	114.3	d	114.4	d
7	55.6	c	55.5	c	55.4	c	55.8	c
8	43.2	t	43.1	t	43.0	t	43.4	t
1'	173.3	s	173.3	s	173.3	s	173.1	s
2'	36.4	t	36.3	t	36.2	t	36.7	t
3'	25.3	t	25.5	t	25.6	t	25.7	t
4'	31.2	t	28.7	t	28.7	t	29.2	t
5'	22.2	t	31.2	t	28.9	t	29.1	t
6'	13.7	c	22.2	t	31.4	t	29.2	t
7'			13.7	c	22.2	t	31.7	t
8'					13.7	c	22.5	t
9'							14.0	c

Tabla 46: Asignaciones de carbono ^{13}C -RMN (ppm) y multiplicidades de los carbonos pertenecientes a los capsaicinoides N6C, N7C, N8C y N9C.

C	N10C		N11C		N12C		N13C	
	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.
4	145.1	s	145.0	s	145.0	s	145.1	s
3	146.7	s	146.7	s	146.7	s	146.7	s
2	110.6	d	110.6	d	110.6	d	110.7	d
1	130.1	s	130.1	s	130.0	s	130.1	s
6	120.5	d	120.4	d	120.3	d	120.6	d
5	114.4	d	114.4	d	114.4	d	114.4	d
7	55.7	c	55.6	c	55.6	c	55.7	c
8	43.3	t	43.2	t	43.2	t	43.4	t
1'	173.2	s	173.2	s	173.2	s	173.1	s
2'	36.6	t	36.5	t	36.5	t	36.7	t
3'	25.7	t	25.7	t	25.7	t	25.7	t
4'	29.3	t	29.4	t	29.4	t	29.2	t
5'	29.2	t	29.3	t	29.4	t	29.3	t
6'	29.2	t	29.2	t	29.3	t	29.4	t
7'	29.1	t	29.2	t	29.2	t	29.5	t
8'	31.7	t	29.1	t	29.1	t	29.5	t
9'	22.5	t	31.7	t	29.1	t	29.3	t
10'	13.9	c	22.5	t	31.7	t	29.2	t
11'			13.9	c	22.4	t	31.8	t
12'					13.9	c	22.6	t
13'							14.0	c

Tabla 47: Asignaciones de carbono ^{13}C -RMN (ppm) y multiplicidades de los carbonos pertenecientes a los capsaicinoides N10C, N11C, N12C y N13C.

C	N14C		N16C	
	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.
4	145.1	s	145.1	s
3	146.7	s	146.7	s
2	110.7	d	110.7	d
1	130.1	s	130.3	s
6	120.5	d	120.7	d
5	114.4	d	114.4	d
7	55.7	c	55.8	c
8	43.3	t	43.4	t
1'	173.2	s	173.0	s
2'	36.6	t	36.8	t
3'	25.7	t	25.8	t
4'	29.2	t	29.3	t
5'	29.2	t	29.3	t
6'	29.4	t	29.5	t
7'	29.5	t	29.6	t
8'	29.5	t	29.6	t
9'	29.5	t	29.6	t
10'	29.2	t	29.6	t
11'	29.2	t	29.6	t
12'	31.8	t	29.5	t
13'	22.5	t	29.3	t
14'	14.0	c	31.9	t
15'			22.6	t
16'			14.1	c

Tabla 48: Asignaciones de carbono ^{13}C -RMN (ppm) y multiplicidades de los carbonos pertenecientes a los capsaicinoides N14C y N16C.

IV. 3. 2. Síntesis de capsinoides.

IV. 3. 2. 1. Introducción.

El objetivo de este apartado del trabajo es llevar a cabo la síntesis de una serie de análogos de los capsinoides naturales, presentando éstos distintas longitudes de cadena (C2-C16), o lo que sería lo mismo decir, distinta lipofilia, además de sintetizar los dos capsinoides naturales más representativos (capsiato y dihidrocapsiato).

En total se han sintetizado 16 capsinoides que cubren un amplio rango de valores de lipofilia ($1,26 < \text{IALog P} < 8,40$). Los capsinoides naturales mayoritarios (capsiato y dihidrocapsiato) tienen unos valores de IALog P de 4,60 y 5,16 respectivamente.

Ya se comentó en el apartado I.6. que existen distintas metodologías de síntesis de capsinoides, las cuales se englobaban en síntesis química y síntesis enzimática. En la presente tesis doctoral se ha desarrollado una metodología completamente nueva para la síntesis de capsinoides, fácil y económica.

Como abreviatura a la nomenclatura de los capsinoides, se ha utilizado, como se ha realizado anteriormente con los capsaicinoides, nombrar a los compuestos sintetizados de esta familia mediante la siguiente forma: OxC. En esta fórmula abreviada, O representa al oxígeno característico de esta familia de compuestos, por formar parte del enlace éster que poseen los capsinoides; xC va a representar el número de carbonos de la cadena lateral que se introduzca para formar cada capsinoide. Por lo tanto, el compuesto que se nombre como O10C, será aquel capsinoide que posea en su cadena lateral lineal 10 átomos de carbono.

IV. 3. 2. 2. Metodología de síntesis de capsinoides.

Se ha desarrollado una nueva metodología para la síntesis de capsinoides, fácil y económica. Esta nueva metodología de síntesis consta de cuatro pasos, los cuales se detallarán a continuación. Los dos primeros pasos son comunes a todos los capsinoides. Los dos últimos pasos se diferencian para cada capsinoide, ya que depende de la longitud de la cadena que se quiera introducir en cada caso.

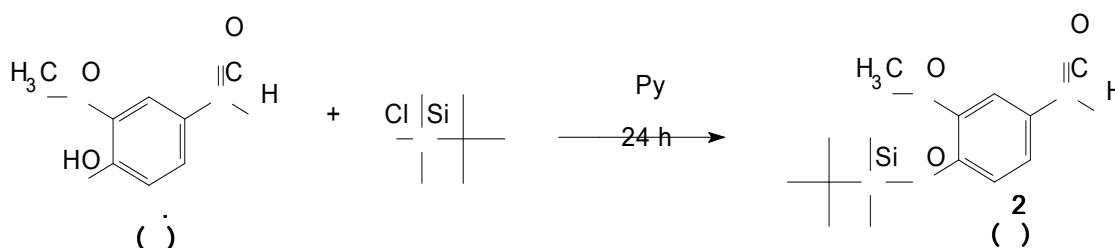
Los espectros de protón ^1H -RMN y los de carbono ^{13}C -RMN han sido realizados en un equipo Varian (INOVA-400), utilizando como disolvente cloroformo deuterado, al igual que se ha comentado para los capsaicinoides.

➤ Paso 1: Sililación de la vainillina.

El producto de partida para la síntesis de los capsinoides ha sido la vainillina (4-hidroxi-3-metoxi-benzaldehído). En un principio se pensó en tener como producto de partida al alcohol vanílico (alcohol 4-hidroxi-3-metoxi-bencílico). Se ensayó primeramente la esterificación directa del alcohol vanílico con los cloruros de acilo, obteniéndose una mezcla de ésteres formados en las dos posiciones hidroxílicas de la molécula, y observándose además la doble esterificación. La separación cromatográfica de estos compuestos resultó difícil. Consecuentemente se optó por proteger el grupo hidroxilo del anillo aromático y esterificar en el otro grupo hidroxilo de la molécula para introducir las cadenas laterales de los capsinoides. Se observó que si se operaba de esta forma, lo que se conseguía era proteger el hidroxilo que se quería esterificar y se esterificaba el hidroxilo aromático.

Por todo ello se pensó utilizar como producto de partida a la vainillina, molécula muy similar al alcohol vanílico, salvo que en lugar de tener dos grupos hidroxilos, únicamente tiene como único hidroxilo al del anillo aromático.

Por tanto se optó por proteger el grupo hidroxilo de la vainillina con cloruro de *t*-butildimetilsililo (esquema de reacción 3), para posteriormente realizar una reducción del grupo aldehído para poder esterificar en esta posición y de esta manera introducir las cadenas laterales de los capsinoides. Se operó de la siguiente manera:



Esquema de reacción 3: *Sililación de la vainillina.*

La vainillina (5,900 g, 0,038 mol) se introduce en un matraz de fondo redondo de 250 mL y se disuelve en unos 30 mL de piridina anhidra. A esta disolución se le añaden 1,2 equivalentes de cloruro de *t*-butil-dimetilsilano (7,012 g, 0,046 mol). La mezcla de reacción se mantiene en agitación magnética a temperatura ambiente y en atmósfera inerte de argón durante 24 horas.

La reacción se sigue por CCF (eluyente: 20 % acetato de etilo, 80 % hexano; revelador: anisaldehído). Concluida la reacción, se detiene con acetato de etilo (100 mL). La fase orgánica (acetato de etilo) se lava varias veces con una disolución acuosa de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ concentrado para eliminar la piridina, hasta que no se observa cambio de color de la disolución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (color celeste).

La fase orgánica se seca con MgSO_4 anhidro, se filtra y se concentra a presión reducida para eliminar el acetato de etilo (rotavapor a temperatura ambiente). Finalmente se obtiene un precipitado amarillento (rendimiento: 97,56 %) que se corresponde con el producto **2** (4-*terc*-butildimetilsililoxi-3-metoxibenzaldehído) al que se le ha llamado vainillina sililada.

Asignaciones de protón y de carbono de la vainillina y de la vainillina sililada.

Vainillina			Vainillina sililada		
H	δ (ppm)	Mult.	H	δ (ppm)	Mult.
2	7.38	d	2	7.35	d
6	7.38	dd	6	7.32	dd
5	7.00	d	5	6.91	d
OH	6.64	s	OCH₃	3.81	s
OCH₃	3.90	s	H (ald.)	9.74	s
H (ald.)	9.77	s	2xCH₃	0.14	s
			3xCH₃	0.95	s

Tabla 49: Asignaciones de protón ^1H -RMN (ppm) y multiplicidad de los protones de la vainillina y de la vainillina sililada.

Vainillina: J(Hz): **3,5**= 1.9; **5,6**= 8.6

Vainillina sililada: J(Hz): **3,5**= 1.8; **5,6**= 8.1

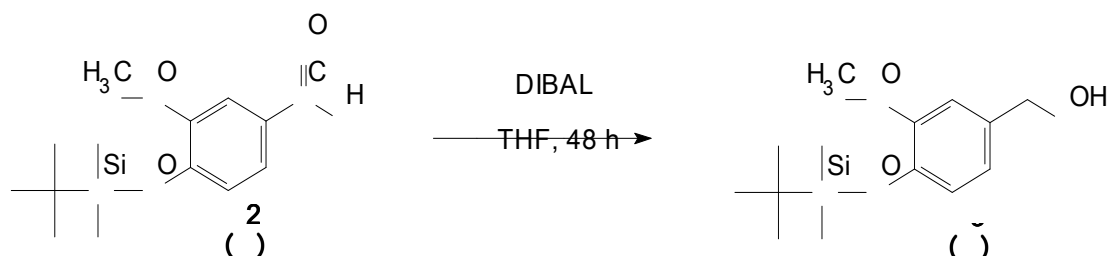
Vainillina			Vainillina sililada		
C	δ (ppm)	Mult.	C	δ (ppm)	Mult.
4	151.8	s	1	151.2	s
3	147.2	s	2	151.4	s
2	108.9	d	3	110.0	d
1	129.6	s	4	130.8	s
6	127.4	d	5	126.0	d
5	114.4	d	6	120.5	d
OCH ₃	56.0	c	OCH ₃	55.3	c
C=O	191.0	d	C=O	190.8	d
			2xCH ₃	-4.7	c
			3xCH ₃	25.4	c
			1xC	18.3	s

Tabla 50: Asignaciones de carbono ^{13}C -RMN (ppm) y multiplicidad de los carbonos de la vainillina y de la vainillina sililada.

➤ **Paso 2: Reducción del carbonilo de la vainillina sililada.**

El siguiente paso de reacción (esquema de reacción 4) consiste en la reducción del grupo carbonilo de la vainillina sililada hasta su correspondiente alcohol. Una vez formado el alcohol, y estando protegido el hidroxilo aromático, se podrán realizar las distintas esterificaciones para formar los capsinoides.

De todos los agentes reductores empleados (borohidruro sódico, borohidruro de litio e hidruro de diisobutilaluminio), el único que ha presentado buenos rendimientos a la hora de producir la reducción ha sido el hidruro de diisobutilaluminio (1M en tolueno) (DIBAL). Este por tanto será el agente reductor que se ha empleado. El modo de operación se comenta a continuación.



Esquema de reacción 4: Reducción del carbonilo de la vainillina sililada con DIBAL.

La vainillina sililada se redujo con hidruro de diisobutilaluminio (1M en tolueno). La vainillina sililada (3,352 g, 0,0125 mol) se disuelve en 40 mL de tetrahidrofurano anhidro. Posteriormente se adiciona lentamente y desde una jeringa 2 equivalentes de hidruro de

diisobutilaluminio (1M en Tolueno) en baño de hielo y se mantiene la mezcla de reacción en agitación magnética, a temperatura ambiente y en atmósfera inerte de argón durante 48 horas.

La reacción se sigue por CCF (eluyente: 20 % acetato de etilo, 80 % hexano; revelador: anisaldehído). Una vez transcurrida la reacción se detiene con agua. La fase acuosa se extrae 3 veces con acetato de etilo (3x100 mL). Esta fase orgánica se seca con MgSO₄ anhidro, se filtra y se concentra a presión reducida para eliminar el acetato de etilo (temperatura ambiente). Finalmente se obtiene un aceite marrón oscuro impuro. Este aceite se disuelve en una pequeña cantidad de acetato de etilo y se le añade sílica gel para obtener la cabeza de la columna de separación. La cabeza de la columna se seca a presión reducida (temperatura ambiente).

La separación cromatográfica se realiza con sílica gel y la polaridad del eluyente es del 10 % de acetato de etilo en hexano. La columna de separación se sigue por CCF (eluyente: 20 % acetato de etilo, 80 % hexano; revelador: anisaldehído). Finalmente se obtiene un aceite marrón oscuro (rendimiento: 74,42 %) que se corresponde con el producto **3** (4-*terc*-butildimetilsiloxi-3-metoxibencil alcohol) al que se le ha llamado vainillina reducida sililada. Este aceite se utilizará como punto de partida para la síntesis de todos los capsinoides sililados.

Asignaciones de protón y de carbono de la vainillina reducida sililada.

Vainillina reducida sililada					
H	δ (ppm)	Mult.	C	δ (ppm)	Mult.
2	6.82	d	1	150.8	s
6	6.72	dd	2	144.3	s
5	6.76	d	3	111.0	d
OCH₃	3.74	s	4	134.6	s
8	4.50	s	5	120.6	d
OH	2.65	s	6	119.3	d
2xCH₃	0.11	s	OCH₃	55.2	c
3xCH₃	0.96	s	8	64.9	t
			2xCH₃	-4.8	c
			3xCH₃	25.6	c
			1xC	18.3	s

Tabla 51: Asignaciones de protón ¹H-RMN (ppm) y de carbono ¹³C-RMN (ppm) y multiplicidades de los protones y carbonos de la vainillina reducida sililada.

Vainillina reducida sililada: J(Hz): **3,5**= 1.8; **5,6**= 8.2

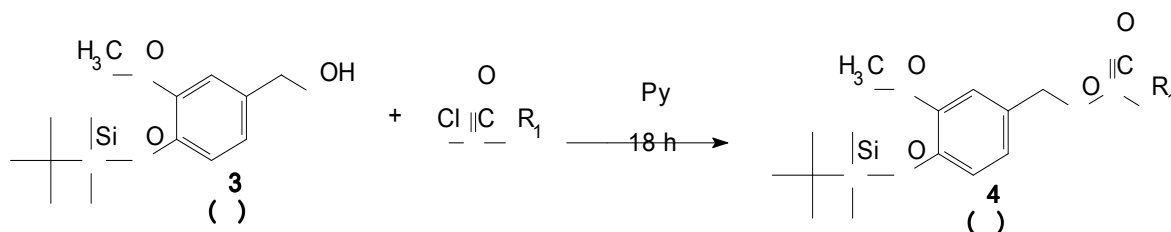
➤ **Formación de cloruros de acilo a partir de sus ácidos correspondientes.**

Al igual que en la síntesis de capsaicinoides, algunos ácidos (ácido undecanoico, ácido tridecanoico, ácido 8-metilnonanoico y ácido *cis*-8-metil-6-nonenoico) han sido transformados en sus correspondientes cloruros de acilo para realizar posteriormente las acilaciones de la vainillina reducida sililada. Se ha tenido que operar de esta manera (esquema de reacción 2) ya que no se dispone comercialmente de los cloruros de acilo de estos ácidos.

Los ácidos se introducen en un matraz de 50 mL de fondo redondo. Se introduce atmósfera inerte de argón. Bajo agitación magnética se adiciona muy lentamente, gota a gota, desde una jeringa una cantidad de cloruro de tionilo suficiente para disolver el ácido. Una vez adicionado el cloruro de tionilo se calienta la mezcla de reacción a 60 °C durante 1 hora. Posteriormente se elimina el cloruro de tionilo en exceso directamente a presión reducida en el rotavapor (20 °C), obteniéndose un aceite transparente. El cloruro de acilo formado se disuelve en una cantidad conocida de tetrahidrofurano anhidro para ser utilizado en las posteriores acilaciones de la vainillina reducida sililada.

➤ **Paso 3: Esterificación de la vainillina reducida sililada con cloruros de acilo.**

El siguiente paso de reacción consiste en la esterificación de la vainillina reducida sililada (**3**) con los cloruros de acilo correspondientes, según el capsinoide que se quiera sintetizar (esquema de reacción 5). Para ello se ha operado de la siguiente manera:



Esquema de reacción 5: *Esterificación de la vainillina reducida sililada con los cloruros de acilo correspondientes.*

La vainillina reducida sililada (**3**) se disuelve en unos 10-15 mL de piridina anhidra en un matraz de 50 mL de fondo redondo. Se introduce atmósfera inerte de argón. A esta disolución se le añade seguidamente el cloruro de acilo correspondiente (2 equivalentes), lentamente, y se deja en agitación durante 18 horas. La reacción se sigue por CCF (eluyente: 20 % acetato de etilo, 80 % hexano; revelador: anisaldehído).

Una vez terminada la reacción, se detiene con acetato de etilo. La fase orgánica (acetato de etilo) se lava 3 veces con HCl al 10 % para eliminar la piridina del medio (3x50 mL). Posteriormente, la fase orgánica se filtra y se seca con MgSO₄ anhidro y se concentra a presión reducida en el rotavapor (T ≈ 30 °C). Se obtiene un aceite pardo, que se disuelve en una pequeña cantidad de acetato de etilo, añadiéndole seguidamente sílica gel para obtener la cabeza de la columna de separación. Se lleva al rotavapor para secar la cabeza de la columna.

La separación cromatográfica se realiza con sílica gel y la polaridad del eluyente es del 20 % de acetato de etilo en hexano. La columna de separación se sigue por CCF (eluyente: 20 % acetato de etilo, 80 % hexano; revelador: anisaldehído). Finalmente se obtiene un aceite amarillento (O2C-O12C) y un precipitado amarillento blanquecino (O13C-O16C).

Los capsinoides sililados sintetizados (4) así como los rendimientos obtenidos vienen recogidos en la tabla 52.

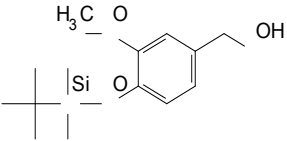
Compuesto inicial	R ₁	Abrev. Producto	Rendimiento
	-CH ₃	O2C Sil.	84.93 %
	-CH ₂ CH ₃	O3C Sil.	88.02 %
	-(CH ₂) ₂ CH ₃	O4C Sil.	92.79 %
	-(CH ₂) ₃ CH ₃	O5C Sil.	88.11 %
	-(CH ₂) ₄ CH ₃	O6C Sil.	94.85 %
	-(CH ₂) ₅ CH ₃	O7C Sil.	98.98 %
	-(CH ₂) ₆ CH ₃	O8C Sil.	95.25 %
	-(CH ₂) ₇ CH ₃	O9C Sil.	93.42 %
	-(CH ₂) ₈ CH ₃	O10C Sil.	96.45 %
	-(CH ₂) ₉ CH ₃	O11C Sil.	92.60 %
	-(CH ₂) ₁₀ CH ₃	O12C Sil.	97.07 %
	-(CH ₂) ₁₁ CH ₃	O13C Sil.	90.32 %
	-(CH ₂) ₁₂ CH ₃	O14C Sil.	94.93 %
	-(CH ₂) ₁₄ CH ₃	O16C Sil.	93.78 %
	-(CH ₂) ₆ CH(CH ₃) ₂	DHCto Sil.	89.69 %
	-(CH ₂) ₄ CH=CHCH(CH ₃) ₂	Capsiato Sil.	84.15 %

Tabla 52: Capsinoides sililados y rendimientos obtenidos en el paso de esterificación.

La numeración que se seguirá para las asignaciones de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de los capsinoides sililados y capsinoides sintetizados se muestran en la figura 57 (ej. producto O16C sililado).

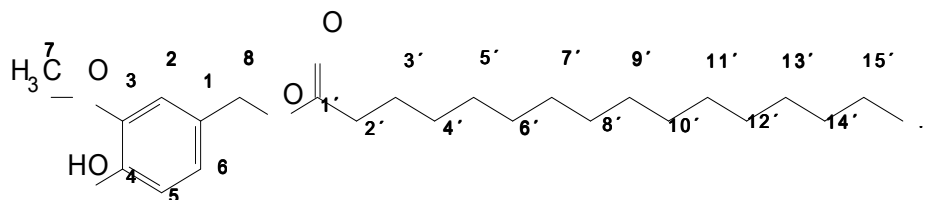


Figura 57: Numeración utilizada en las asignaciones de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de los capsinoides sililados y capsinoides sintetizados.

Las nomenclaturas químicas de los productos sintetizados en este paso de reacción son las siguientes:

O2C Sililado: Etanoato de 4-*terc*-butildimetilsililoxi-3-metoxibencilo.

O3C Sililado: Propanoato de 4-*terc*-butildimetilsililoxi-3-metoxibencilo.

O4C Sililado: Butanoato de 4-*terc*-butildimetilsililoxi-3-metoxibencilo.

O5C Sililado: Pentanoato de 4-*terc*-butildimetilsililoxi-3-metoxibencilo.

O6C Sililado: Hexanoato de 4-*terc*-butildimetilsililoxi-3-metoxibencilo.

O7C Sililado: Heptanoato de 4-*terc*-butildimetilsililoxi-3-metoxibencilo.

O8C Sililado: Octanoato de 4-*terc*-butildimetilsililoxi-3-metoxibencilo.

O9C Sililado: Nonanoato de 4-*terc*-butildimetilsililoxi-3-metoxibencilo.

O10C Sililado: Decanoato de 4-*terc*-butildimetilsililoxi-3-metoxibencilo.

O11C Sililado: Undecanoato de 4-*terc*-butildimetilsililoxi-3-metoxibencilo.

O12C Sililado: Dodecanoato de 4-*terc*-butildimetilsililoxi-3-metoxibencilo.

O13C Sililado: Tridecanoato de 4-*terc*-butildimetilsililoxi-3-metoxibencilo.

O14C Sililado: Tetradecanoato de 4-*terc*-butildimetilsililoxi-3-metoxibencilo.

O16C Sililado: Hexadecanoato de 4-*terc*-butildimetilsililoxi-3-metoxibencilo.

Dihidrocapsiato sililado: 8-Metilnonanoato de 4-*terc*-butildimetilsililoxi-3-metoxibencilo.

➤ **Asignaciones de protón ^1H -RMN y constantes de acoplamiento (J) de los capsinoides sililados sintetizados.**

Como se ha comentado, se han sintetizado 16 capsinoides sililados de la manera anteriormente descrita. Las asignaciones de protón (δ), expresadas en ppm, y las multiplicidades de los protones de los 15 capsinoides sintetizados (el capsiato se comentará posteriormente debido a su peculiaridad) vienen recogidas a continuación (tablas 53, 54, 55 y 56), además de sus constantes de acoplamiento (Hz).

H	O2C Sil.		O3C Sil.		O4C Sil.		O5C Sil.	
	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.
2	6.84	s ^a	6.84	s ^a	6.84	s ^a	6.82	s ^a
6	6.81	d ^b	6.80	d ^b	6.80	d ^b	6.79	d ^b
5	6.81	d ^b	6.80	d ^b	6.80	d ^b	6.79	d ^b
2xCH ₃	0.14	s	0.14	s	0.14	s	0.13	s
3xCH ₃	0.98	s	0.98	s	0.98	s	0.97	s
7	3.80	s	3.80	s	3.78	s	3.77	s
8	5.01	s	5.03	s	5.02	s	5.00	s
2'	2.08	s	2.36	c	2.31	t	2.31	t
3'			1.15	t	1.65	tc	1.60	q
4'					0.92	t	1.31	tc
5'							0.87	t

Tabla 53: Asignaciones de protón ¹H-RMN (ppm) y multiplicidades de los protones pertenecientes a los capsinoides sililados O2C sil., O3C sil., O4C sil. y O5C sil. s^a (singlete ancho); d^b (doblete ancho).

H	O6C Sil.		O7C Sil.		O8C Sil.		O9C Sil.	
	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.
2	6.82	s ^a	6.83	s ^a	6.82	s ^a	6.82	s ^a
6	6.79	d ^b	6.79	d ^b	6.78	d ^b	6.78	d ^b
5	6.79	d ^b	6.79	d ^b	6.78	d ^b	6.78	d ^b
2xCH ₃	0.13	s	0.13	s	0.12	s	0.12	s
3xCH ₃	0.97	s	0.97	s	0.97	s	0.97	s
7	3.77	s	3.78	s	3.77	s	3.77	s
8	5.01	s	5.01	s	5.00	s	5.00	s
2'	2.31	t	2.32	t	2.31	t	2.31	t
3'	1.61	q	1.61	q	1.61	q	1.61	q
4'	1.27	m	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m
5'	1.27	m	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m
6'	0.85	t	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m
7'			0.85	t	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m
8'					0.85	t	1.22-1.29	m
9'							0.85	t

Tabla 54: Asignaciones de protón $^1\text{H-RMN}$ (ppm) y multiplicidades de los protones pertenecientes a los capsinoides sililados O6C sil., O7C sil., O8C sil. y O9C sil. s^a (singlete ancho); d^b (doblete ancho).

H	O10C Sil.		O11C Sil.		O12C Sil.		O13C Sil.	
	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.
2	6.82	s^a	6.83	s^a	6.82	s^a	6.82	s^a
6	6.78	d^b	6.80	d^b	6.78	d^b	6.77	d^b
5	6.78	d^b	6.80	d^b	6.78	d^b	6.77	d^b
2xCH ₃	0.13	s	0.14	s	0.14	s	0.11	s
3xCH ₃	0.97	s	0.98	s	0.98	s	0.96	s
7	3.77	s	3.79	s	3.87	s	3.76	s
8	5.01	s	5.02	s	5.02	s	4.99	s
2'	2.31	t	2.32	t	2.31	t	2.30	t
3'	1.61	q	1.62	q	1.61	q	1.60	q
4'	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m
5'	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m
6'	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m
7'	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m
8'	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m
9'	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m
10'	0.85	t	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m
11'			0.86	t	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m
12'					0.86	t	1.22-1.29	m
13'							0.84	t

Tabla 55: Asignaciones de protón $^1\text{H-RMN}$ (ppm) y multiplicidades de los protones pertenecientes a los capsinoides sililados O10C sil., O11C sil., O12C sil. y O13C sil. s^a (singlete ancho); d^b (doblete ancho).

H	O14C Sil.		O16C Sil.		DHCto Sil.	
	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.
2	6.84	s^a	6.84	s^a	6.83	s^a
6	6.80	d^b	6.80	d^b	6.80	d^b
5	6.80	d^b	6.80	d^b	6.80	d^b
2xCH ₃	0.15	s	0.15	s	0.14	s
3xCH ₃	0.98	s	0.98	s	0.98	s

7	3.79	s	3.87	s	3.79	s
8	5.02	s	5.01	s	5.02	s
2'	2.33	t	2.31	t	2.32	t
3'	1.63	q	1.61	q	1.62	q
4'	1.21-1.29	m	1.21-1.29	m	1.21-1.29	m
5'	1.21-1.29	m	1.21-1.29	m	1.21-1.29	m
6'	1.21-1.29	m	1.21-1.29	m	1.21-1.29	m
7'	1.21-1.29	m	1.21-1.29	m	1.13	q
8'	1.21-1.29	m	1.21-1.29	m	1.49	m
9'	1.21-1.29	m	1.21-1.29	m	0.85	d
10'	1.21-1.29	m	1.21-1.29	m	0.85	d
11'	1.21-1.29	m	1.21-1.29	m		
12'	1.21-1.29	m	1.21-1.29	m		
13'	1.21-1.29	m	1.21-1.29	m		
14'	0.87	t	1.21-1.29	m		
15'			1.21-1.29	m		
16'			0.86	t		

Tabla 56: Asignaciones de protón ^1H -RMN (ppm) y multiplicidades de los protones pertenecientes a los capsinoides sililados O14C sil., O16C sil. y dihidrocapsiato sil. s^a (singlete ancho); d^b (doblete ancho).

O3C Sil.: J(Hz): 2',3' = 7.6

O4C Sil.: J(Hz): 2',3' = 7.6; 3',4' = 7.2

O5C Sil.: J(Hz): 2',3' = 7.6; 3',4' = 7.6; 4',5' = 7.2

O6C Sil.: J(Hz): 2',3' = 7.6; 3',4' = 7.6; 4',5' = 7.2; 5',6' = 6.8

O7C Sil.: J(Hz): 2',3' = 7.6; 3',4' = 7.2; 6',7' = 6.8

O8C Sil.: J(Hz): 2',3' = 7.6; 3',4' = 7.3; 7',8' = 6.8

O9C Sil.: J(Hz): 2',3' = 7.6; 3',4' = 7.2; 8',9' = 6.8

O10C Sil.: J(Hz): 2',3' = 7.6; 3',4' = 7.2; 9',10' = 6.8

O11C Sil.: J(Hz): 2',3' = 7.6; 3',4' = 7.2; 10',11' = 6.8

O12C Sil.: J(Hz): 2',3' = 7.6; 3',4' = 7.2; 11',12' = 6.8

O13C Sil.: J(Hz): 2',3' = 7.6; 3',4' = 7.2; 12',13' = 6.8

O14C Sil.: J(Hz): 2',3'= 7.6; 3',4'= 7.2; 13',14'= 6.8

O16C Sil.: J(Hz): 2',3'= 7.6; 3',4'= 7.2; 15',16'= 6.8

Dihidrocapsiato Sil.: J(Hz): 2',3'= 7.6 ; 3',4'= 7.6 ; 7',8'= 6.4 ; 8',9'= 6.4 ; 8',10'= 6.4

Asignaciones de carbono ^{13}C -RMN de los capsinoides sililados.

Los espectros de carbono (^{13}C -RMN) han sido llevados a cabo en un equipo Varian (INOVA-400), utilizando como disolvente cloroformo deuterado. Las asignaciones de carbono (δ) y sus multiplicidades, de los 15 capsinoides sintetizados (las del capsiato se comentaran aparte), vienen recogidas a continuación (tablas 57, 58, 59 y 60).

C	O2C Sil.		O3C Sil.		O4C Sil.		O5C Sil.	
	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.
4	150.9	s	150.9	s	150.8	s	151.1	s
3	145.2	s	145.1	s	145.0	s	145.3	s
2	112.6	d	112.5	d	112.4	d	112.7	d
1	129.2	s	129.4	s	129.5	s	129.8	s
6	121.2	d	121.1	d	121.0	d	121.3	d
5	120.8	d	120.7	d	120.6	d	120.9	d
OCH ₃	55.4	c	55.4	c	55.3	c	55.6	c
8	66.4	t	66.2	t	66.0	t	66.3	t
2xCH ₃	-4.6	c	-4.7	c	-4.7	c	-4.5	c
3xCH ₃	25.7	c	25.7	c	25.6	c	25.9	c
1xC	18.4	s	18.4	s	18.3	s	18.6	s
1'	170.9	s	174.3	s	173.4	s	173.8	s
2'	21.1	c	27.6	t	36.1	t	34.2	t
3'			9.1	c	18.3	t	27.2	t
4'					13.5	c	22.4	t
5'							13.9	c

Tabla 57: Asignaciones de carbono ^{13}C -RMN (ppm) y multiplicidades de los carbonos pertenecientes a los capsinoides sililados O2C sil., O3C sil., O4C sil. y O5C sil.

C	O6C Sil.		O7C Sil.		O8C Sil.		O9C Sil.	
	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.
4	150.8	s	150.8	s	150.8	s	150.8	s
3	145.0	s	145.0	s	145.0	s	145.0	s
2	112.4	d	112.4	d	112.4	d	112.4	d
1	129.4	s	129.4	s	129.4	s	129.7	s
6	121.0	d	121.1	d	121.0	d	121.0	d
5	120.6	d	120.7	d	120.6	d	120.6	d
OCH ₃	55.3	c	55.3	c	55.3	c	55.3	c
8	66.0	t	66.1	t	66.0	t	66.0	t
2xCH ₃	-4.8	c	-4.7	c	-4.8	c	-4.8	c
3xCH ₃	25.6	c	25.6	c	25.6	c	25.6	c
1xC	18.3	s	18.3	s	18.3	s	18.3	s
1'	173.5	s	173.6	s	173.6	s	173.6	s
2'	34.2	t	34.3	t	34.3	t	34.3	t
3'	24.5	t	24.8	t	24.9	t	24.9	t
4'	31.2	t	28.7	t	29.0	t	29.0	t
5'	22.2	t	31.3	t	28.8	t	29.1	t
6'	13.8	c	22.4	t	31.5	t	29.0	t
7'			13.9	c	22.5	t	31.7	t
8'					13.9	c	22.5	t
9'							13.9	c

Tabla 58: Asignaciones de carbono ¹³C-RMN (ppm) y multiplicidades de los carbonos pertenecientes a los capsinoides sililados O6C sil., O7C sil., O8C sil. y O9C sil.

C	O10C Sil.		O11C Sil.		O12C Sil.		O13C Sil.	
	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.
4	150.8	s	150.9	s	150.8	s	150.8	s
3	145.0	s	145.1	s	145.0	s	145.0	s
2	112.3	d	112.4	d	111.2	d	112.4	d
1	129.4	s	129.5	s	127.9	s	129.4	s
6	121.0	d	121.1	d	121.9	d	121.0	d
5	120.6	d	120.7	d	114.3	d	120.6	d
OCH ₃	55.3	c	55.4	c	55.4	c	55.3	c
8	66.0	t	66.1	t	66.1	t	66.0	t
2xCH ₃	-4.8	c	-4.7	c	-4.8	c	-4.8	c
3xCH ₃	25.6	c	25.6	c	25.6	c	25.6	c
1xC	18.3	s	18.4	s	18.3	s	18.3	s
1'	173.6	s	173.7	s	173.8	s	173.6	s
2'	34.2	t	34.3	t	34.3	t	34.3	t
3'	24.9	t	24.9	t	24.9	t	24.9	t
4'	29.0	t	29.1	t	29.1	t	29.0	t
5'	29.2	t	29.3	t	29.3	t	29.2	t
6'	29.3	t	29.5	t	29.5	t	29.4	t
7'	29.2	t	29.4	t	29.4	t	29.5	t
8'	31.7	t	29.2	t	29.3	t	29.5	t
9'	22.5	t	31.8	t	29.2	t	29.5	t
10'	14.0	c	22.6	t	31.8	t	29.2	t
11'			14.1	c	22.6	t	31.8	t
12'					14.0	c	22.6	t
13'							14.0	c

Tabla 59: Asignaciones de carbono ¹³C-RMN (ppm) y multiplicidades de los carbonos pertenecientes a los capsinoides sililados O10C sil., O11C sil., O12C sil. y O13C sil.

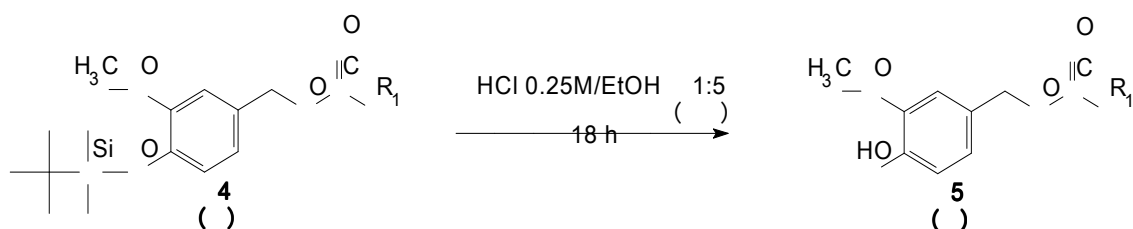
C	O14C Sil.		O16C Sil.		DHCto Sil.	
	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.
4	150.8	s	150.8	s	150.9	s
3	145.0	s	145.0	s	145.1	s
2	112.4	d	112.4	d	112.5	d
1	129.5	s	129.5	s	129.5	s
6	121.7	d	121.1	d	121.1	d
5	120.7	d	120.7	d	120.7	d
OCH ₃	55.3	c	55.3	c	55.4	c
8	66.1	t	66.1	t	66.2	t
2xCH ₃	-4.7	c	-4.7	c	-4.7	c
3xCH ₃	25.6	c	25.6	c	25.7	c
1xC	18.3	s	18.3	s	18.4	s
1'	173.6	s	173.7	s	173.8	s
2'	34.3	t	34.3	t	34.4	t
3'	24.9	t	24.9	t	25.0	t
4'	29.1	t	29.1	t	29.5	t
5'	29.2	t	29.2	t	29.1	t
6'	29.6	t	29.4	t	27.2	t
7'	29.6	t	29.5	t	38.9	t
8'	29.6	t	29.6	t	27.9	d
9'	29.5	t	29.6	t	22.6	c
10'	29.4	t	29.6	t	22.6	c
11'	29.3	t	29.6	t		
12'	31.9	t	29.6	t		
13'	22.6	t	29.3	t		
14'	14.0	c	31.9	t		
15'			22.6	t		
16'			14.0	c		

Tabla 60: Asignaciones de carbono ¹³C-RMN (ppm) y multiplicidades de los carbonos pertenecientes a los capsinoides sililados O14C sil., O16C sil. y dihidrocapsiato sil.

➤ **Paso 4: Dessililación de los capsinoides sililados.**

El último paso que se requiere para la síntesis completa de los capsinoides es la dessililación de los compuestos anteriormente formados. En un principio se utilizó como agente desprotector el fluoruro de tetra *n*-butil amonio (TBAF). Al utilizar el TBAF se observó que se producía la desprotección, pero también se producía la ruptura del enlace éster formado, obteniéndose como producto de la reacción el alcohol vanílico.

Se tuvo por tanto, que pensar en otro procedimiento para desproteger el grupo hidroxilo del anillo aromático. Esto se consiguió utilizando en la reacción una mezcla HCl 0,25 M / etanol en la proporción 1:5. De esta manera se consiguió la desprotección sin observarse la pérdida del enlace éster. Se observó además que si se utilizaban concentraciones superiores a 0,25 M de HCl, se comenzaba a romper el enlace éster formado, produciéndose en esa posición una eterificación con el etanol presente en el medio, tanto más grande cuanto mayor era la molaridad del HCl utilizado. Por lo tanto, para las desprotecciones de los capsinoides sililados se ha operado de la siguiente manera (esquema de reacción 6):



Esquema de reacción 6: *Desprotección de los capsinoides sililados.*

A los capsinoides sililados sintetizados en el paso anterior se les ha eliminado el grupo *t*-butil-dimetilsililo mediante la adición de la una mezcla de HCl 0,25M / Etanol (1:5). Los capsinoides sililados se han introducido en un matraz de fondo redondo de 250 mL y se les adiciona aproximadamente 80 mL de la mezcla de HCl 0,25M / Etanol (1:5). Se introduce atmósfera inerte de argón y se mantiene la mezcla de reacción en agitación durante 18 horas. La reacción se sigue mediante CCF (eluyente: 20 % acetato de etilo, 80 % hexano; revelador: anisaldehído).

Una vez terminada la reacción, se detiene con salmuera. La fase acuosa se extrae 3 veces con acetato de etilo (3x100 mL). Se reúnen las tres fases orgánicas, se secan con MgSO₄ anhidro y se concentran a vacío en el rotavapor para eliminar el acetato de etilo (temperatura ambiente). El aceite obtenido se disuelve en una pequeña cantidad de acetato de etilo y se le adiciona sílica gel para formar la cabeza de la columna para la purificación del producto final. La cabeza de la columna se seca a presión reducida (temperatura ambiente).

La separación cromatográfica se realiza con sílica gel y la polaridad del eluyente debe ser del 15 % de acetato de etilo en hexano. La columna de separación se sigue por CCF (eluyente: 20 % acetato de etilo, 80 % hexano; revelador: anisaldehído). Finalmente se obtiene un aceite blanquecino, que corresponde con los capsinoides sintetizados.

Los compuestos que se han formado aparecen en la siguiente tabla:

Compuesto de partida	R ₁	Compuesto formado	Rendimiento
O2C Sililado	-CH ₃	O2C	78.59 %
O3C Sililado	-CH ₂ CH ₃	O3C	81.78 %
O4C Sililado	-(CH ₂) ₂ CH ₃	O4C	85.30 %
O5C Sililado	-(CH ₂) ₃ CH ₃	O5C	82.46 %
O6C Sililado	-(CH ₂) ₄ CH ₃	O6C	86.97 %
O7C Sililado	-(CH ₂) ₅ CH ₃	O7C	79.24 %
O8C Sililado	-(CH ₂) ₆ CH ₃	O8C	85.02 %
O9C Sililado	-(CH ₂) ₇ CH ₃	O9C	80.69 %
O10C Sililado	-(CH ₂) ₈ CH ₃	O10C	85.55 %
O11C Sililado	-(CH ₂) ₉ CH ₃	O11C	78.83 %
O12C Sililado	-(CH ₂) ₁₀ CH ₃	O12C	84.28 %
O13C Sililado	-(CH ₂) ₁₁ CH ₃	O13C	79.11 %
O14C Sililado	-(CH ₂) ₁₂ CH ₃	O14C	84.09 %
O16C Sililado	-(CH ₂) ₁₄ CH ₃	O16C	82.54 %
Dihidrocapsiato Sil.	-(CH ₂) ₆ CH(CH ₃) ₂	Dihidrocapsiato	77.25 %

Tabla 61: Capsinoides sintetizados y rendimientos en el paso de la dessililación.

Las nomenclaturas químicas de los productos sintetizados en este paso de reacción son las siguientes:

O2C: Etanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo.

O3C: Propanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo.

O4C: Butanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo.

O5C: Pentanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo.

O6C: Hexanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo.

O7C: Heptanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo.

O8C: Octanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo.

O9C: Nonanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo.

O10C: Decanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo.

O11C: Undecanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo.

O12C: Dodecanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo.

O13C: Tridecanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo.

O14C: Tetradecanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo.

O16C: Hexadecanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo.

Dihidrocapsiato: 8-Metilnonanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo.

Asignaciones de protón ^1H -RMN y constantes de acoplamiento (J) de los capsinoides sintetizados.

Como se ha comentado, se han sintetizado 16 capsinoides de la manera anteriormente descrita. Las asignaciones de protón (δ), expresadas en ppm, y las multiplicidades de los protones de los 15 capsinoides sintetizados (el capsiato se comentará posteriormente debido a su peculiaridad) vienen recogidas a continuación (tablas 62, 63, 64 y 65), además de sus constantes de acoplamiento (Hz).

H	O2C		O3C		O4C		O5C	
	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.
2	6.86	d	6.84	d	6.82	d	6.85	d
6	6.85	dd	6.83	dd	6.81	dd	6.84	dd
5	6.88	d	6.86	d	6.84	d	6.87	d
OH	5.79	s	5.94	s	-	s	5.95	s
OCH ₃	3.88	s	3.84	s	3.82	s	3.85	s
8	5.01	s	5.00	s	4.98	s	5.01	s
2'	2.07	s	2.33	c	2.27	t	2.32	t
3'			1.11	t	1.61	tc	1.60	q
4'					0.88	t	1.32	tc
5'							0.88	t

Tabla 62: Asignaciones de protón ^1H -RMN (ppm) y multiplicidades de los protones pertenecientes a los capsinoides O2C, O3C, O4C y O5C.

H	O6C		O7C		O8C		O9C	
	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.
2	6.82	d	6.85	d	6.86	d	6.85	d
6	6.81	dd	6.84	dd	6.85	dd	6.84	dd
5	6.84	d	6.87	d	6.88	d	6.87	d
OH	5.85	s	6.03	s	6.30	s	6.06	s
OCH ₃	3.86	s	3.85	s	3.85	s	3.86	s
8	5.02	s	5.01	s	5.01	s	5.01	s
2'	2.32	t	2.31	t	2.31	t	2.31	t
3'	1.62	q	1.60	q	1.61	q	1.61	q
4'	1.28	m	1.27	m	1.26	m	1.25	m
5'	1.28	m	1.27	m	1.26	m	1.25	m
6'	0.87	t	1.27	m	1.26	m	1.25	m

7'		0.85	t	1.26	m	1.25	m
8'				0.85	t	1.25	m
9'						0.85	t

Tabla 63: Asignaciones de protón $^1\text{H-RMN}$ (ppm) y multiplicidades de los protones pertenecientes a los capsinoides O6C, O7C, O8C y O9C.

H	O10C		O11C		O12C		O13C	
	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.
2	6.85	d	6.86	d	6.86	d	6.86	d
6	6.84	dd	6.85	dd	6.85	dd	6.85	dd
5	6.87	d	6.88	d	6.88	d	6.88	d
OH	5.76	s	5.72	s	5.78	s	6.49	s
OCH ₃	3.86	s	3.88	s	3.87	s	3.87	s
8	5.01	s	5.01	s	5.02	s	5.02	s
2'	2.31	t	2.31	t	2.31	t	2.32	t
3'	1.61	q	1.61	q	1.61	q	1.62	q
4'	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m
5'	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m
6'	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m
7'	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m
8'	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m
9'	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m
10'	0.86	t	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m
11'			0.86	t	1.22-1.29	m	1.22-1.29	m
12'					0.87	t	1.22-1.29	m
13'							0.87	t

Tabla 64: Asignaciones de protón $^1\text{H-RMN}$ (ppm) y multiplicidades de los protones pertenecientes a los capsinoides O10C, O11C, O12C y O13C.

H	O14C		O16C		DHCto	
	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.
2	6.86	d	6.85	d	6.86	d
6	6.85	dd	6.84	dd	6.85	dd
5	6.88	d	6.87	d	6.88	d
OH	5.75	s	-	s	5.78	s
OCH ₃	3.87	s	3.87	s	3.87	s
8	5.02	s	5.01	s	5.02	s
2'	2.31	t	2.31	t	2.32	t
3'	1.61	q	1.61	q	1.62	q
4'	1.21-1.29	m	1.21-1.29	m	1.21-1.29	m
5'	1.21-1.29	m	1.21-1.29	m	1.21-1.29	m
6'	1.21-1.29	m	1.21-1.29	m	1.21-1.29	m
7'	1.21-1.29	m	1.21-1.29	m	1.12	q
8'	1.21-1.29	m	1.21-1.29	m	1.49	m
9'	1.21-1.29	m	1.21-1.29	m	0.84	d
10'	1.21-1.29	m	1.21-1.29	m	0.84	d
11'	1.21-1.29	m	1.21-1.29	m		
12'	1.21-1.29	m	1.21-1.29	m		
13'	1.21-1.29	m	1.21-1.29	m		
14'	0.87	t	1.21-1.29	m		
15'			1.21-1.29	m		
16'			0.86	t		

Tabla 65: Asignaciones de protón ¹H-RMN (ppm) y multiplicidades de los protones pertenecientes a los capsinoides O14C, O16C y Dihidrocapsiato.

O2C: J(Hz): 3,5= 1.8; 5,6= 6.4

O3C: J(Hz): 3,5= 1.8; 5,6= 7.3; 2',3'= 7.6

O4C: J(Hz): 3,5= 1.8; 5,6= 7.6; 2',3'= 7.6; 3',4'= 7.3

O5C: J(Hz): 3,5= 1.8; 5,6= 7.3; 2',3'= 7.6; 3',4'= 7.2; 4',5'= 7.2

O6C: J(Hz): 3,5= 1.8; 5,6= 6.7; 2',3'= 7.6; 3',4'= 7.6; 4',5'= 7.2; 5',6'= 7.2

O7C: J(Hz): 3,5= 1.8; 5,6= 7.0; 2',3'= 7.6; 3',4'= 7.6; 6',7'= 7.2

O8C: J(Hz): 3,5= 1.8; 5,6= 6.7; 2',3'= 7.6; 3',4'= 7.6; 7',8'= 6.8

O9C: J(Hz): 3,5= 1.8; 5,6= 7.0; 2',3'= 7.6; 3',4'= 7.6; 8',9'= 6.8

O10C: J(Hz): 3,5= 1.8; 5,6= 6.4; 2',3'= 7.6; 3',4'= 7.2; 9',10'= 7.2

O11C: J(Hz): 3,5= 1.8; 5,6= 6.7; 2',3'= 7.6; 3',4'= 7.2; 10',11'= 7.0

O12C: J(Hz): 3,5= 1.8; 5,6= 6.1; 2',3'= 7.6; 3',4'= 7.2; 11',12'= 6.8

O13C: J(Hz): 3,5= 1.8; 5,6= 6.7; 2',3'= 7.6; 3',4'= 7.2; 12',13'= 6.8

O14C: J(Hz): 3,5= 1.8; 5,6= 5.6; 2',3'= 7.6; 3',4'= 7.2; 13',14'= 6.8

O16C: J(Hz): 3,5= 1.8; 5,6= 5.9; 2',3'= 7.6; 3',4'= 7.2; 15',16'= 6.8

Dihidrocapsiato: J(Hz): 3,5= 1.8; 5,6= 5.9; 2',3'= 7.6 ; 3',4'= 7.6 ; 7',8'= 6.4 ; 8',9'= 6.4 ; 8',10'= 6.4

Asignaciones de carbono ^{13}C -RMN de los capsinoides sintetizados

Los espectros de carbono (^{13}C -RMN) han sido llevados a cabo en un equipo Varian (INOVA-400), utilizando como disolvente cloroformo deuterado. Las asignaciones de carbono (δ) y sus multiplicidades, de los 15 capsinoides sintetizados (las del capsiato se comentaran aparte), vienen recogidas a continuación (tablas 66, 67, 68 y 69).

C	O2C		O3C		O4C		O5C	
	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.
4	145.8	s	145.7	s	145.7	s	145.7	s
3	146.5	s	146.5	s	146.5	s	146.4	s
2	111.3	d	111.2	d	111.2	d	111.2	d
1	127.7	s	127.8	s	127.8	s	127.8	s
6	122.0	d	121.8	d	121.7	d	121.8	d
5	114.3	d	114.3	d	114.3	d	114.3	d
OCH ₃	55.9	c	55.7	c	55.7	c	55.7	c
8	66.5	t	66.2	t	66.1	t	66.2	t
1'	171.0	s	174.3	s	173.5	s	173.7	s
2'	21.0	c	27.5	t	36.0	t	33.9	t
3'			8.9	c	18.2	t	26.9	t
4'					13.4	c	22.1	t
5'							13.5	c

Tabla 66: Asignaciones de carbono ^{13}C -RMN (ppm) y multiplicidades de los carbonos pertenecientes a los capsinoides O2C, O3C, O4C y O5C.

C	O6C		O7C		O8C		O9C	
	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.
4	145.7	s	145.7	s	145.7	s	145.7	s
3	146.4	s	146.5	s	146.5	s	146.5	s
2	111.2	d	111.2	d	111.2	d	111.2	d
1	127.9	s	127.9	s	127.9	s	127.9	s
6	121.9	d	121.9	d	121.9	d	121.9	d
5	114.3	d	114.3	d	114.3	d	114.3	d
OCH ₃	55.8	c	55.8	c	55.8	c	55.8	c
8	66.2	t	66.2	t	66.2	t	66.2	t
1'	173.8	s	173.8	s	173.8	s	173.8	s
2'	34.2	t	34.3	t	34.3	t	34.3	t
3'	24.5	t	24.8	t	24.9	t	24.9	t
4'	31.2	t	28.7	t	28.9	t	29.0	t
5'	22.2	t	31.3	t	28.8	t	29.1	t
6'	13.8	c	22.4	t	31.5	t	29.0	t
7'			13.9	c	22.5	t	31.7	t
8'					13.9	c	22.5	t
9'							14.0	c

Tabla 67: Asignaciones de carbono ¹³C-RMN (ppm) y multiplicidades de los carbonos pertenecientes a los capsinoides O6C, O7C, O8C y O9C.

C	O10C		O11C		O12C		O13C	
	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.
4	145.7	s	145.7	s	145.7	s	145.7	s
3	146.5	s	146.4	s	146.5	s	146.5	s
2	111.2	d	111.2	d	111.2	d	111.2	d
1	127.9	s	128.0	s	127.9	s	127.9	s
6	121.9	d	121.9	d	121.9	d	121.9	d
5	114.3	d	114.3	d	114.3	d	114.3	d
OCH ₃	55.8	c	55.9	c	55.8	c	55.8	c
8	66.2	t	66.2	t	66.2	t	66.2	t
1'	173.8	s	173.8	s	173.8	s	173.8	s
2'	34.3	t	34.3	t	34.3	t	34.3	t
3'	24.9	t	24.9	t	24.9	t	24.9	t
4'	29.0	t	29.1	t	29.1	t	29.1	t
5'	29.2	t	29.2	t	29.2	t	29.2	t

6'	29.3	t	29.5	t	29.5	t	29.4	t
7'	29.2	t	29.4	t	29.5	t	29.6	t
8'	31.8	t	29.2	t	29.4	t	29.5	t
9'	22.6	t	31.8	t	29.3	t	29.5	t
10'	14.0	c	22.6	t	31.8	t	29.3	t
11'			14.0	c	22.6	t	31.8	t
12'					14.0	c	22.6	t
13'							14.0	c

Tabla 68: Asignaciones de carbono ^{13}C -RMN (ppm) y multiplicidades de los carbonos pertenecientes a los capsinoides O10C, O11C, O12C y O13C.

C	O14C		O16C		Dihidrocapsiato	
	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.	δ (ppm)	Mult.
4	145.7	s	145.7	s	145.7	s
3	146.4	s	146.5	s	146.5	s
2	111.2	d	111.2	d	111.2	d
1	127.9	s	128.0	s	127.9	s
6	121.9	d	121.9	d	121.9	d
5	114.3	d	114.3	d	114.3	d
OCH ₃	55.8	c	55.9	c	55.8	c
8	66.2	t	66.2	t	66.2	t
1'	173.8	s	173.8	s	173.8	s
2'	34.3	t	34.3	t	34.3	t
3'	24.9	t	24.9	t	24.9	t
4'	29.1	t	29.0	t	29.4	t
5'	29.2	t	29.1	t	29.1	t
6'	29.4	t	29.3	t	27.1	t
7'	29.5	t	29.4	t	38.9	t
8'	29.6	t	29.5	t	27.9	d
9'	29.6	t	29.6	t	22.5	c
10'	29.6	t	29.6	t	22.5	c
11'	29.3	t	29.6	t		
12'	31.9	t	29.6	t		
13'	22.6	t	29.2	t		
14'	14.0	c	31.9	t		
15'			22.6	t		
16'			14.0	c		

Tabla 69: Asignaciones de carbono ^{13}C -RMN (ppm) y multiplicidades de los carbonos pertenecientes a los capsinoides O14C, O16C y dihidrocapsiato.

IV. 3. 2. 3. Síntesis del capsiato.

El capsiato (figura 58) es el capsinoide mayoritario encontrado en la planta “CH-19 Sweet”. Este compuesto presenta la misma cadena lateral que la capsaicina, por lo que presenta un doble enlace *trans* en la misma. Esto hace que su síntesis sea más compleja que la síntesis de sus anteriores análogos. Se ha llevado a cabo la síntesis de dicho compuesto, partiendo para ello del ácido *cis*-8-metil-6-nonenoico, el cual se encuentra disponible comercialmente. Por lo tanto, lo primero que ha de realizarse para la síntesis del capsiato será la isomerización de este doble enlace a su forma *trans*.

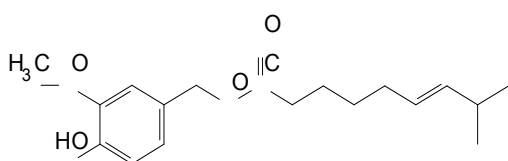
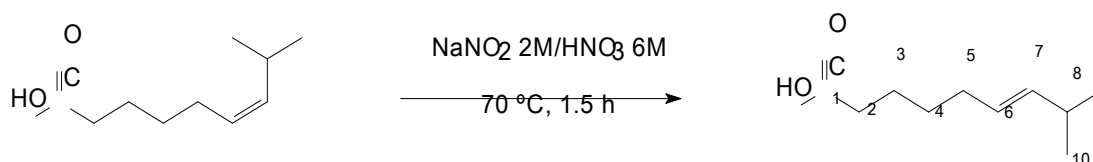


Figura 58: Molécula de capsiato.

➤ Isomerización de ácido *cis*-8-metil-6-nonenoico.

Como se ha comentado anteriormente, se ha realizado la isomerización del ácido *cis*-8-metil-6-nonenoico al correspondiente ácido *trans*-8-metil-6-nonenoico (esquema de reacción 7). Para ello se han empleado 0,310 g (1,823 mmol) del ácido *cis*-8-metil-6-nonenoico y se le han adicionado 310 μL de NaNO_2 2M y 215 μL de HNO_3 6M. La mezcla de reacción se ha puesto bajo agitación magnética vigorosa y en atmósfera inerte de argón y se ha calentado a 70 °C durante 1,5 horas. Transcurrido este tiempo, se ha dejado enfriar la mezcla de reacción. Una vez enfriada la reacción, se han adicionado unos 100 mL de éter etílico. La fase orgánica se ha lavado una vez con agua (1x50 mL) y tres veces con salmuera (3x50 mL). Posteriormente, se ha recogido la fase orgánica y se ha secado con MgSO_4 anhidro para eliminar la humedad, se ha filtrado y se ha concentrado a presión reducida y en baño de hielo. Finalmente se ha obtenido un aceite amarillento verdoso (0,3134 g) al que se le ha realizado la espectroscopía correspondiente.



Esquema de reacción 7: Isomerización del ácido *cis*-8-metil-6-nonenoico al ácido *trans*-8-metil-6-nonenoico.

Asignaciones de protón y de carbono del ácido *cis*-8-metil-6-nonenoico y del ácido *trans*-8-metil-6-nonenoico.

ácido <i>cis</i> -8-metil-6-nonenoico			ácido <i>trans</i> -8-metil-6-nonenoico		
H	δ (ppm)	Mult.	H	δ (ppm)	Mult.
COOH	-	s	COOH	-	s
2	2.35	t	2	2.31	t
3	1.64	tt (q)	3	1.59	tt (q)
4	1.39	tt (q)	4	1.36	tt (q)
5	2.04	td	5	1.96	td
6	5.11	dt	6	5.28	dt
7	5.20	dd	7	5.35	dd
8	2.56	dh	8	2.18	dh
9 y 10	0.93	d	9 y 10	0.92	d

Tabla 70: Asignaciones de protón ^1H -RMN (ppm) y multiplicidad de los protones del ácido *cis*-8-metil-6-nonenoico y del ácido *trans*-8-metil-6-nonenoico.

Ácido *cis*-8-metil-6-nonenoico: J(Hz): 2,3= 7.4; 3,4= 7.4; 4,5= 7.4; 5,6= 5.9; 6,7=7.4; 7,8=6.2; 8,9 y 10= 7.0

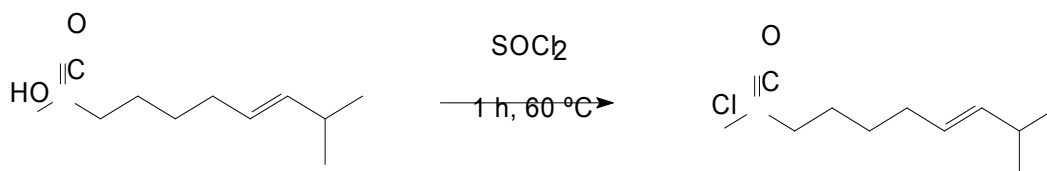
Ácido *trans*-8-metil-6-nonenoico: J(Hz): 2,3= 7.5; 3,4= 7.8; 4,5= 7.3; 5,6= 6.1; 6,7= 15.5; 7,8= 5.9; 8,9 y 10= 6.7

ácido <i>cis</i> -8-metil-6-nonenoico			ácido <i>trans</i> -8-metil-6-nonenoico		
C	δ (ppm)	Mult.	C	δ (ppm)	Mult.
COOH	179.7	s	COOH	179.9	s
2	33.9	t	2	33.9	t
3	24.3	t	3	24.0	t
4	29.2	t	4	28.9	t
5	26.8	t	5	32.0	t
6	126.6	d	6	126.3	d
7	138.1	d	7	138.0	d
8	26.5	d	8	30.9	d
9 y 10	23.2	c	9 y 10	22.5	c

Tabla 71: Asignaciones de carbono ^{13}C -RMN (ppm) y multiplicidad del ácido *cis*-8-metil-6-nonenoico y del ácido *trans*-8-metil-6-nonenoico.

➤ **Formación del cloruro de acilo del ácido *trans*-8-metil-6-nonenoico.**

El ácido *trans*-8-metil-6-nonenoico ha sido transformado en el correspondiente cloruro de acilo para la posterior acilación de la vainillina reducida sililada (**3**) (esquema de reacción 8), tal como se comentó anteriormente con la síntesis de capsinoides.



Esquema de reacción 8: *Formación del cloruro de acilo del ácido *trans*-8-metil-6-nonenoico.*

El ácido *trans*-8-metil-6-nonenoico se introduce en un matraz de 50 mL de fondo redondo. Se introduce atmósfera inerte de argón. Bajo agitación magnética se adiciona muy lentamente desde una jeringa una cantidad de cloruro de tionilo suficiente para disolver el ácido. Una vez adicionado el cloruro de tionilo, la mezcla de reacción se calienta a 60 °C durante 1 hora. Posteriormente se elimina el cloruro de tionilo en exceso directamente bajo presión reducida en el rotavapor (20 °C), obteniéndose un aceite amarillo verdoso. El cloruro de acilo formado se disuelve en una cantidad conocida de tetrahidrofurano anhidro para ser utilizado en las posteriores acilaciones de la vainillina reducida y sililada (**3**).

➤ **Esterificación de la vainillina reducida y sililada (**3**) con el cloruro del ácido *trans*-8-metil-6-nonenoico.**

Como se comentó anteriormente con los capsinoides en el paso 3 de reacción, en este caso, para la síntesis del capsiato se requiere la esterificación de la vainillina reducida sililada (**3**) con el cloruro del ácido *trans*-8-metil-6-nonenoico (esquema de reacción 5).

La vainillina reducida y sililada (**3**) se disuelve en unos 10-15 mL de piridina anhidra en un matraz de 50 mL de fondo redondo. Se hace atmósfera inerte de argón. A esta disolución se le añade el cloruro del ácido *trans*-8-metil-6-nonenoico y se deja en agitación durante 18 horas. La reacción se sigue por CCF (eluyente: 20 % acetato de etilo, 80 % hexano; revelador: anisaldehído). La vainillina reducida y sililada estaba en exceso.

Una vez terminada la reacción, se detiene con acetato de etilo. La fase orgánica (acetato de etilo) se lava 3 veces con HCl al 10 % para eliminar la piridina del medio (3x50 mL). La fase orgánica se filtra y se seca con MgSO₄ anhidro y se concentra a presión reducida en el rotavapor (T ≈ 30 °C). Se obtiene un aceite pardo, que se disuelve en una pequeña cantidad de acetato de etilo y se le añade sílica gel para obtener la cabeza de la columna de separación. Se lleva al rotavapor para secar la cabeza de la columna.

La separación cromatográfica se realiza con sílica gel y la polaridad del eluyente es del 15 % de acetato de etilo en hexano. La columna de separación se sigue por CCF (eluyente: 20 % acetato de etilo, 80 % hexano; revelador: anisaldehído). Finalmente se

obtiene un aceite amarillento que se corresponde con el producto *E*-8-metil-6-nonenoato de 4-*tert*-butildimetilsililoxi-3-metoxibencilo (capsiato sililado (figura 59)).

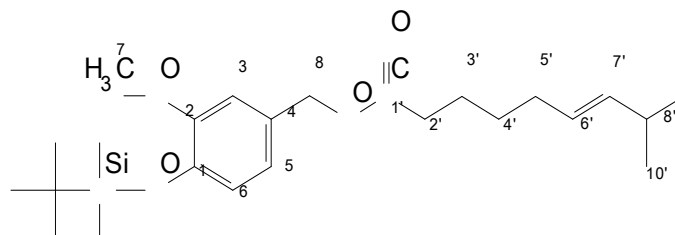


Figura 59: Molécula del capsiao sililado.

Asignaciones de protón y de carbono del capsiao sililado.

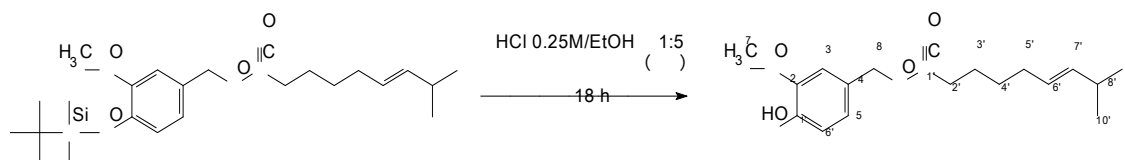
Capsiao sililado					
H	δ (ppm)	Mult.	C	δ (ppm)	Mult.
2	6.83	s ancho	4	150.9	s
6	6.80	t ancho	3	145.1	s
5	6.80	t ancho	2	112.4	d
7	3.79	s	1	129.3	s
8	5.02	s	6	121.1	d
2xCH ₃	0.14	s	5	120.7	d
3xCH ₃	0.98	s	7	55.4	c
2	2.33	t	8	66.2	t
3	1.63	tt (q)	2xCH ₃	-4.7	c
4	1.36	tt (q)	3xCH ₃	25.7	c
5	1.97	td	1xC	18.4	s
6	5.29	dt	1	173.6	s
7	5.36	dd	2	34.2	t
8	2.20	dh	3	24.4	t
9 y 10	0.94	d	4	29.1	t
			5	32.1	t
			6	126.4	d
			7	138.0	d
			8	30.9	d
			9 y 10	22.6	c

Tabla 72: Asignaciones de protón ¹H-RMN y de carbono ¹³C-RMN y multiplicidades de los protones y carbonos del capsiao sililado.

Capsiao sililado: J(Hz): 2',3'= 7.5; 3',4'= 7.8; 4',5'= 7.6; 5',6'= 6.1; 6',7'= 15.2; 7',8'= 5.9; 8',9' y 10'= 6.7

➤ **Dessilación del capsiato sililado.**

Como se ha comentado con la síntesis de los capsinoides, el último paso de reacción consiste en la desprotección del grupo hidroxilo del anillo para tener finalmente el capsiato (esquema de reacción 9). Para ello, igual que se comentó anteriormente, se ha utilizado para la desprotección una mezcla HCl 0,25 M / etanol en la proporción 1:5.



Esquema de reacción 9: *Desprotección del capsiato sililado.*

Al capsiato sililado (0,565 g) se le ha eliminado el grupo t-butil-dimetilsililo mediante la adición de la mezcla de HCl 0,25M / Etanol (1:5). El capsiato sililado se introduce en un matraz de fondo redondo de 250 mL y se le adicionan 80 mL de la mezcla de HCl 0,25M / Etanol (1:5). Se introduce atmósfera inerte de argón y se mantiene la mezcla de reacción en agitación durante 18 horas. La reacción se sigue mediante CCF (eluyente: 20 % acetato de etilo, 80 % hexano; revelador: oleum).

Una vez terminada la reacción, se detiene con salmuera. La fase acuosa se extrae 3 veces con acetato de etilo (3x100 mL). Se reúnen las tres fases orgánicas, se secan con MgSO₄ anhidro y se concentran a vacío en el rotavapor para eliminar el acetato de etilo. El aceite obtenido se disuelve en una pequeña cantidad de acetato de etilo y se le adiciona sílica gel para formar la cabeza de la columna para la purificación del producto final. La cabeza de la columna se seca a vacío en el rotavapor.

La separación cromatográfica se realiza con sílica gel y la polaridad del eluyente es del 10 % de acetato de etilo en hexano. La columna de separación se sigue por CCF (eluyente: 20 % acetato de etilo, 80 % hexano; revelador: oleum). Finalmente se obtiene un aceite blanquecino que se corresponde con el producto *E*-8-metil-6-nonenoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo (**capsiato**).

Asignaciones de protón y de carbono del capsiato.

Capsiato					
H	δ (ppm)	Mult.	C	δ (ppm)	Mult.
2	6.82	s ancho	4	145.7	s
6	6.80	t ancho	3	146.4	s
5	6.80	t ancho	2	111.2	d
OH	-	s	1	127.9	s
7	3.79	s	6	121.9	d
8	5.01	s	5	114.3	d
2'	2.34	t	7	55.8	c
3'	1.64	tt (q)	8	66.2	t
4'	1.38	tt (q)	1'	173.8	s
5'	1.98	td	2'	34.3	t
6'	5.30	dt	3'	24.5	t
7'	5.37	dd	4'	29.1	t
8'	2.21	dh	5'	32.1	t
9' y 10'	0.95	d	6'	126.4	d
			7'	138.1	d
			8'	30.9	d
			9' y 10'	22.6	c

Tabla 73: Asignaciones de protón ^1H -RMN y de carbono ^{13}C -RMN y multiplicidades de los protones y carbonos del capsiato.

Capsiato: J(Hz): 2',3'= 7.5; 3',4'= 7.8; 4',5'= 7.6; 5',6'= 6.1; 6',7'= 15.2; 7',8'= 5.9; 8',9' y 10'= 6.7

IV. 3. 3. Desarrollo de métodos cromatográficos para la separación de capsaicinoides y capsinoides.

En este apartado del trabajo se han desarrollado métodos cromatográficos de separación de los capsaicinoides y capsinoides sintetizados en los apartados anteriores. Para ello se han utilizado las dos columnas estudiadas en el capítulo IV.1.:

- **Columna C-18** convencional: **Phenomenex, Luna** (150 mm x 30 mm, 5 μ m).
- **Columna monolítica: Chromolith Performance RP-18e** (100 mm x 4,6 mm).

El desarrollo de los distintos métodos cromatográficos se ha realizado en el sistema cromatográfico **Dionex**. Las fases móviles utilizadas han sido las mismas que se utilizaron para el desarrollo de los métodos de separación de los capsaicinoides naturales.

- ☞ **Disolvente A** (0,1 % v/v ácido acético en agua).
- ☞ **Disolvente B** (0,1 % v/v ácido acético en metanol).

Para la detección de los capsaicinoides y capsinoides, se ha empleado la espectroscopia de absorción UV-Vis. La longitud de onda utilizada para la detección de estos compuestos ha sido de 278 nm.

IV. 3. 3. 1. Separación de capsaicinoides.

Se han desarrollado dos métodos de separación de capsaicinoides, cada uno de ellos con una de las columnas anteriormente expuesta. Los capsaicinoides que se han separado con estos dos métodos cromatográficos desarrollados han sido los 14 capsaicinoides sintetizados (N2C-N16C) además de los dos capsaicinoides naturales comerciales mayoritarios presentes en los pimientos (capsaicina y dihidrocapsaicina).

IV. 3. 3. 1. 1. Separación de capsaicinoides mediante el empleo de la columna C-18.

Se ha desarrollado un método de separación de 16 capsaicinoides mediante el empleo de la cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa utilizando una columna C-18 convencional (Phenomenex, Luna (150 mm x 30 mm, 5 μ m)).

En el método de separación desarrollado, se ha empleado una temperatura de 35 °C en la columna y un flujo de disolvente de 0,8 mL/min, parámetros que resultaron óptimos para este tipo de columnas con estos compuestos.

El gradiente óptimo de separación empleado ha sido el siguiente: 0 min., 10 % B; 2 min., 50 % B; 22 min., 70 % B; 28 min., 90 % B; 32 min., 100 % B. El cromatograma resultante empleando este método desarrollado viene recogido en la figura 60.

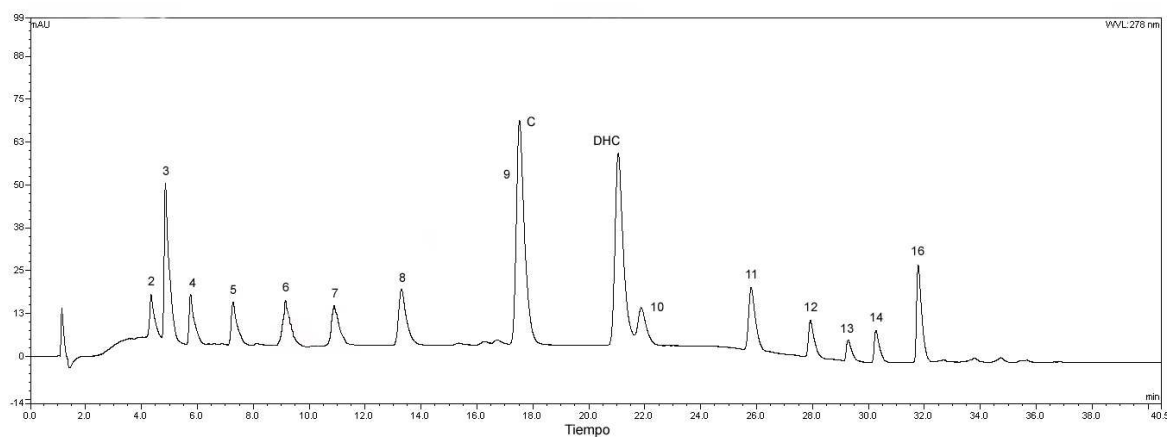


Figura 60: Cromatograma de separación de capsaicinoides empleando una columna HPLC convencional C-18 (Luna 5 μ , 150 x 3 mm, Phenomenex). 2 (N2C); 3 (N3C); 4 (N4C); 5 (N5C); 6 (N6C); 7 (N7C); 8 (N8C); 9 (N9C); C (Capsaicina); DHC (Dihidrocapsaicina); 10 (N10C); 11 (N11C); 12 (N12C); 13 (N13C); 14 (N14C); 16 (N16C).

Los tiempos de retención para cada capsaicinoide vienen recogidos a continuación (tabla 74)

Capsaicinoide	Tiempo de Retención (min.)
N2C	4,35
N3C	4,86
N4C	5,76
N5C	7,27
N6C	9,32
N7C	11,16
N8C	13,29
N9C	17,52
Capsaicina	17,52
Dihidrocapsaicina	21,05
N10C	21,08
N11C	25,81
N12C	27,92
N13C	29,27
N14C	30,27
N16C	31,78

Tabla 74: *Tiempos de retención de los capsaicinoides separados mediante el empleo de la columna C-18 convencional.*

A la vista de la tabla 74 se observa que el último capsaicinoide eluido (N16C) aparece en el minuto 31,78. También se observa (figura 60) que la separación entre los capsaicinoides N9C y capsaicina no ha sido óptima.

IV. 3. 3. 1. 2. Separación de capsaicinoides mediante el empleo de una columna monolítica.

También se ha desarrollado un método de separación de los 16 capsaicinoides mediante el empleo de la cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa utilizando una columna monolítica (Chromolith Performance RP-18e (100 mm x 4,6 mm)).

En el método de separación desarrollado, se ha empleado una temperatura de 30 °C en la columna y un flujo de disolvente de 6 mL/min, parámetros que resultaron óptimos para este tipo de columnas con estos compuestos.

El gradiente óptimo de separación empleado ha sido el siguiente: 0 min., 20 % B; 1 min., 30 % B; 2,5 min., 50 % B; 6 min., 70 % B; 7 min., 80 % B; 8 min., 95 % B; 10 min., 100 % B. El cromatograma resultante empleando este método desarrollado viene recogido en la figura 61.

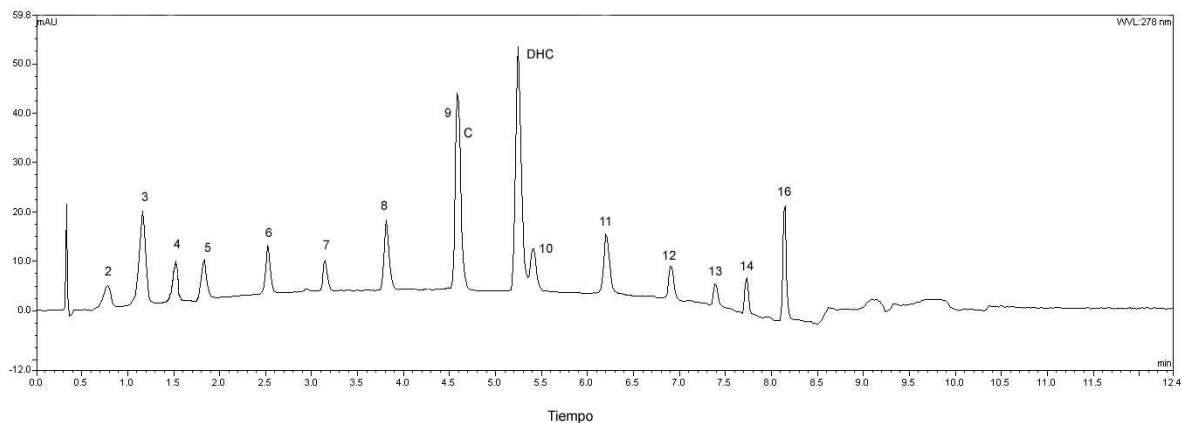


Figura 61: Cromatograma de separación de capsaicinoides empleando una columna monolítica (*Chromolith Performance RP-18e* (100 mm x 4,6 mm)). 2 (N2C); 3 (N3C); 4 (N4C); 5 (N5C); 6 (N6C); 7 (N7C); 8 (N8C); 9 (N9C); C (Capsaicina); DHC (Dihidrocapsaicina); 10 (N10C); 11 (N11C); 12 (N12C); 13 (N13C); 14 (N14C); 16 (N16C).

Los tiempos de retención para cada capsaicinoide vienen recogidos a continuación (tabla 75)

Capsaicinoide	Tiempo de Retención (min.)
N2C	0,78
N3C	1,68
N4C	1,83
N5C	2,21
N6C	2,52
N7C	3,15
N8C	3,82
N9C	4,58
Capsaicina	4,58
Dihidrocapsaicina	5,25
N10C	5,42
N11C	6,20
N12C	6,90
N13C	7,38
N14C	7,73
N16C	8,15

Tabla 75: Tiempos de retención de los capsaicinoides separados mediante el empleo de la columna monolítica.

En la tabla 75 se observa que el último capsaicinoide eluido (N16C) aparece en el minuto 8,15. Este mismo capsaicinoide se eluia en el minuto 31,78 con el método desarrollado con la columna C-18 convencional. Se tiene por tanto que se ha conseguido acortar el tiempo de análisis aproximadamente a la cuarta parte mediante el empleo de columnas monolíticas.

También se observa (figura 61), como ocurría con la columna C-18 convencional, que no se ha conseguido la separación entre los capsaicinoides N9C y capsaicina.

IV. 3. 3. 2. Separación de capsinoides.

Al igual que se ha realizado con los capsaicinoides, se han desarrollado dos métodos cromatográficos de separación de capsinoides, cada uno de ellos con una de las columnas anteriormente expuesta. Los capsinoides que se han separado con estos dos métodos cromatográficos desarrollado han sido los 16 capsinoides sintetizados (N2C-N16C) que incluyen los dos capsaicinoides naturales mayoritarios presentes en determinadas variedades de pimientos (capsiato y dihidrocapsiato).

IV. 3. 3. 2. 1. Separación de capsinoides mediante el empleo de la columna C-18.

Se ha desarrollado un método de separación de 16 capsinoides mediante el empleo de la cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa utilizando una columna C-18 convencional (Phenomenex, Luna (150 mm x 30 mm, 5 μ m)).

Se han empleado las mismas condiciones que en el caso anterior para los capsaicinoides (35 °C de temperatura y 0,8 mL/min de flujo de disolvente).

El gradiente óptimo de separación empleado ha sido el siguiente: 0 min., 10 % B; 2 min., 45 % B; 30 min., 80 % B; 28 min., 40 min., 100 % B. El cromatograma resultante empleando este método desarrollado viene recogido en la figura 62.

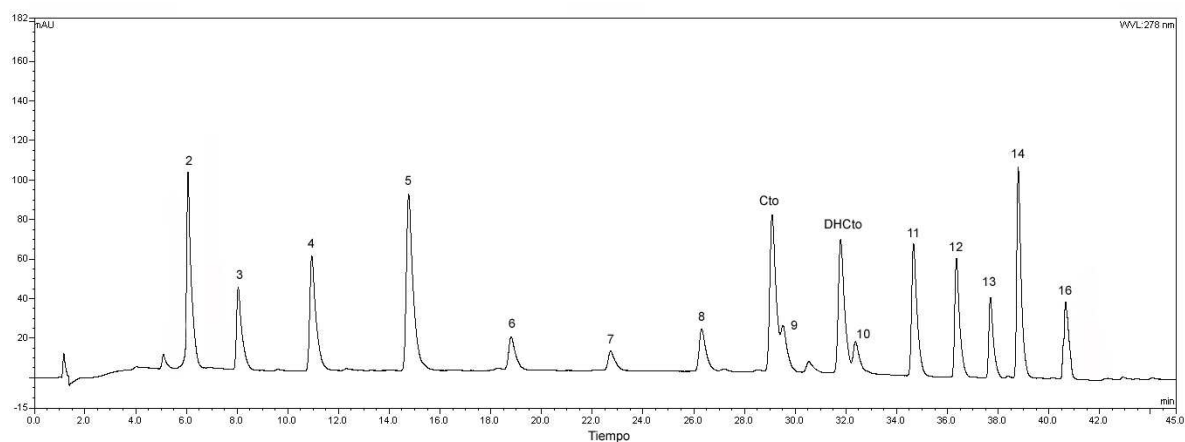


Figura 62: Cromatograma de separación de capsinoides empleando una columna HPLC convencional C-18 (Luna 5 μ , 150 x 3 mm, Phenomenex). 2 (O2C); 3 (O3C); 4 (O4C); 5 (O5C); 6 (O6C); 7 (O7C); 8 (O8C); Cto (Capsiato); 9 (N9C); DHCto (Dihidrocapsiato); 10 (O10C); 11 (O11C); 12 (O12C); 13 (O13C); 14 (O14C); 16 (O16C).

Los tiempos de retención para cada capsinoide vienen recogidos a continuación (tabla 76)

Capsinoide	Tiempo de Retención (min.)
O2C	6,07
O3C	8,05
O4C	10,95
O5C	14,76
O6C	18,81
O7C	22,73
O8C	26,25
Capsiato	29,09
O9C	29,52
Dihidrocapsiato	31,79
O10C	32,38
O11C	34,66
O12C	36,35
O13C	37,69
O14C	38,79
O16C	40,82

Tabla 76: Tiempos de retención de los capsinoides separados mediante el empleo de la columna C-18 convencional.

Se observa (tabla 76) que el último capsinoide eluido (O16C) aparece en el minuto 40,82, tiempo superior que el empleado para los capsaicinoides. También se observa (figura 62) que con esta familia de compuestos, se consigue separar y diferenciar el capsiato del compuesto O9C, lo cual no se conseguía con los capsaicinoides N9C y capsaicina.

IV. 3. 3. 2. 2. Separación de capsinoides mediante el empleo de una columna monolítica.

Por último, se ha desarrollado un método de separación de los 16 capsinoides mediante el empleo de la cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa utilizando una columna monolítica (Chromolith Performance RP-18e (100 mm x 4,6 mm)).

Para ello, se ha empleado una temperatura de 30 °C en la columna y un flujo de disolvente de 6 mL/min, parámetros que resultaron óptimos para este tipo de columnas con los capsaicinoides.

El gradiente óptimo de separación empleado ha sido el siguiente: 0 min., 20 % B; 1 min., 40 % B; 7 min., 68 % B; 8,5 min., 77 % B; 10 min., 88 % B; 12 min., 100 % B. El cromatograma resultante empleando este método desarrollado viene recogido en la figura 63.

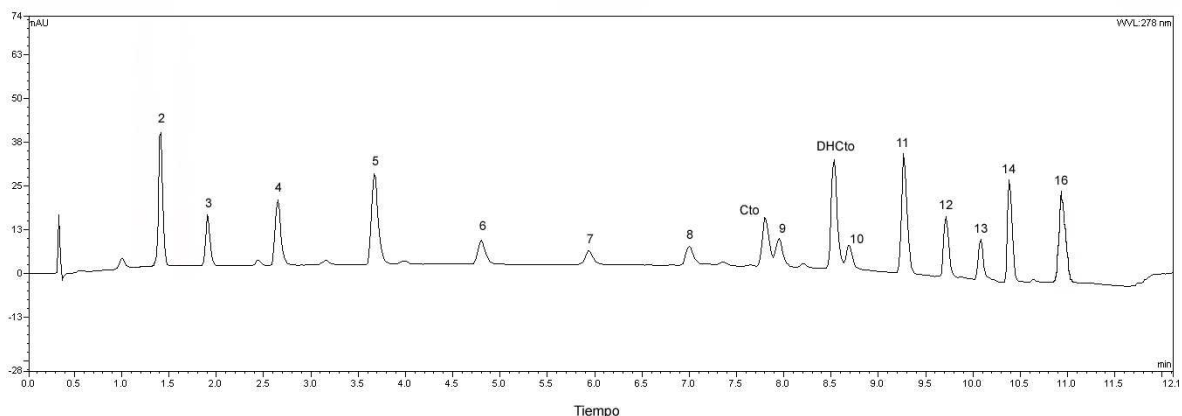


Figura 63: Cromatograma de separación de capsinoides empleando una columna monolítica (Chromolith Performance RP-18e (100 mm x 4,6 mm)). 2 (O2C); 3 (O3C); 4 (O4C); 5 (O5C); 6 (O6C); 7 (O7C); 8 (O8C); Cto (Capsiato); 9 (N9C); DHcto (Dihidrocapsiato); 10 (O10C); 11 (O11C); 12 (O12C); 13 (O13C); 14 (O14C); 16 (O16C).

Los tiempos de retención para cada capsinoide vienen recogidos a continuación (tabla 77)

Capsinoide	Tiempo de Retención (min.)
O2C	1,42
O3C	1,90
O4C	2,65
O5C	3,67
O6C	4,80
O7C	5,93
O8C	7,00
Capsiato	7,80
O9C	7,95
Dihidrocapsiato	8,53
O10C	8,68
O11C	9,27
O12C	9,72
O13C	10,08
O14C	10,38
O16C	10,94

Tabla 77: *Tiempos de retención de los capsinoides separados mediante el empleo de la columna monolítica.*

Se observa (tabla 77) que el último capsinoide eluido (O16C) aparece en el minuto 10,94. Este mismo capsinoide se eluia en el minuto 40,82 con el método desarrollado con la columna C-18 convencional. De nuevo, con los capsinoides, se ha conseguido acortar el tiempo de análisis aproximadamente a la cuarta parte mediante el empleo de columnas monolíticas.

También se observa (figura 63), que con la columna monolítica se consigue una mejor separación del capsiato y del O9C, que con la que se obtenía al emplear la columna C-18 convencional.

IV. 3. 3. 3. Conclusiones.

De este trabajo, se puede obtener como conclusión, que los capsinoides y capsainoides sintetizados (a excepción de los compuestos N9C y capsaicina) se pueden separar mediante el empleo de la cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa, utilizando tanto columnas C-18 convencionales como columnas monolíticas, en tiempos aproximadamente cuatro veces más cortos empleando estas últimas columnas.

IV. 3. 4. Estudio de la relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR).

Introducción.

En la nueva metodología de búsqueda de compuestos activos, los estudios de la relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR) constituyen una herramienta clave para el análisis sistemático de las estructuras de las moléculas y las propiedades bioactivas que presentan. Se necesita una adecuada correlación entre la estructura y la actividad que presentan las moléculas para la búsqueda de las estructuras con mejores propiedades físicas, químicas y biológicas.²⁷³

Los estudios QSAR han sido ampliamente utilizados para el diseño y descubrimiento de nuevos fármacos y drogas.²⁷⁴ Actualmente también se están empleando estas metodologías para el diseño de agroquímicos.

Los requisitos físico-químicos que regulan el comportamiento de compuestos bioactivos, como pueden ser los capsaicinoides o capsinoides, no dependen exclusivamente de la estructura química de éstos, es decir, de los grupos reactivos presentes en la molécula. Existe un cierto perfil físico-químico necesario para que el compuesto bioactivo pueda ser absorbido y transportado a su lugar de acción.

Estas propiedades han sido ampliamente estudiadas en el campo de la química farmacéutica en un intento de correlacionarlas con la actividad biológica que presentan²⁷⁵ y pueden resumirse en la llamada “Regla de los cinco”.

En la nueva metodología de búsqueda de compuestos activos, los estudios de la relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR) constituyen una herramienta clave para el análisis sistemático de las estructuras de las moléculas y las propiedades bioactivas que presentan. Se necesita una adecuada correlación entre la estructura y la actividad que presentan las moléculas para la búsqueda de las estructuras con mejores propiedades físicas, químicas y biológicas.

Se tiene por lo tanto que la actividad que pueda presentar una molécula, no sólo va a venir determinada por el número de centros activos que posea, sino también por la facilidad que presente dicha molécula a ser transportada, para que pueda realizar su acción en los sitios específicos de las células.

²⁷³ H. Kubinyi. “Strategies and recent Technologies in drug discovery”. Pharmazie, 50: 647-662, 1995.

²⁷⁴ Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney. “Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings”. Advanced Drug Delivery Reviews, 46: 3-26, 2001.

²⁷⁵ S.D. Krämer. “Absorption prediction from physicochemical parameters”. Pharmaceutical Science & Technology Today, 2: 373-380, 1999.

IV. 3. 4. 1. Regla de los cinco de Lipinsky.

La regla de Lipinski²⁷⁴ correlaciona las actividades biológicas de determinados compuestos con las propiedades físico-químicas de los mismos. Esta regla fue establecida por Lipinski y se basa en cuatro reglas experimentales que delimitan las propiedades físico-químicas de una molécula activa.

En este estudio, se analizaron los valores de masa molecular, log P calculado y número de átomos donadores y aceptores de enlaces de hidrógeno para 2000 fármacos que entraron en la fase II de ensayos clínicos. Los resultados mostraron lo siguiente:

Masa molecular: La mayoría de los fármacos estudiados presentan una masa límite menor de 500 uma. El incremento de este parámetro o de su tamaño se ha relacionado con una peor solubilidad y una penetración más pobre a través de las membranas.²⁷⁶

Dadores y aceptores de enlaces de hidrógeno: El valor óptimo fue determinado como menor o igual a 5 para los dadores y menor o igual que 10 para los aceptores. Aquellos compuestos con altos valores para cualquiera de estos parámetros son a menudo bastante insolubles en muchos disolventes poco polares debido a la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares.

Log P: El coeficiente de partición octanol-agua es una propiedad física que describe las propiedades lipofílicas o hidrofílicas de un compuesto. Este parámetro se comentará a continuación y su valor límite establecido por Lipinski fue $\text{Log P} \leq 5$.

Las reglas propuestas por Lipinski vienen recogidas en la tabla 78.

Parámetro	Fármaco
Masa Molecular	≤ 500
Log P	≤ 5
Dadores enlace-H	≤ 5
Aceptores enlace-H	≤ 10

Tabla 78: Reglas propuestas por Lipinski para fármacos.

Los principios activos han de cumplir los requerimientos de ser absorbidos, trasladados o traslocados hasta los lugares de acción y de unión a sus correspondientes dianas, por lo que deben de existir unos valores óptimos para estos requerimientos.

Además de estas propiedades, existen otras que influyen en la actividad biológica de un compuesto, como su solubilidad, su tamaño, su superficie (total y polar), etc. Teniendo en cuenta las premisas anteriormente mencionadas sobre los requerimientos, tanto estructurales como a nivel de propiedades físico-químicas, en la presente memoria se

²⁷⁶ R.A. Fecick, K.E. Frank, E.J. Gentry, S.R. Menon, L.A. Mitscher, H. Telikepalli. "The search for orally active medications through combinatorial chemistry". Medicinal Research Reviews, 18: 149-185, 1998.

presenta un estudio de la relación entre la estructura y la actividad que poseen los capsaicinoides y los capsinoides con distinta longitud de cadena lateral (distinta lipofilia).

IV. 3. 4. 2. El coeficiente de partición octanol-agua (P).

La lipofilia es un parámetro relacionado con la capacidad de una molécula de cruzar las membranas biológicas. La lipofilia/hidrofilia es un factor determinante en la absorción de cualquier producto bioactivo, así como en su disponibilidad en el interior de la célula. Cualquier compuesto que pretenda ser activo, debe alcanzar en último lugar el sitio de acción dentro del organismo-objetivo, independientemente del tipo de transporte que utilice: difusión pasiva, transporte activo, transporte facilitado, etc., por lo que debe de existir un equilibrio entre la solubilidad del compuesto en agua (el vehículo usual) y la lipofilia necesaria para atravesar las membranas celulares. Por lo tanto, en su camino hacia el sitio de acción, el compuesto tiene que distribuirse entre las membranas, de naturaleza lipídica, y los fluidos biológicos de carácter acuoso.

Aunque puedan variar en su tipo y proporción de una membrana a otra, los principales constituyentes de las membranas son los fosfolípidos, el colesterol, los esfingolípidos y los glucolípidos, todos ellos de naturaleza anfipática. Es por ello, que para que un compuesto activo cruce las membranas y alcance el sitio de acción, debe existir un balance entre sus propiedades lipofílicas e hidrofílicas.

El coeficiente de partición octanol-agua (P) es una propiedad ampliamente usada que describe estas propiedades lipofílicas o hidrofílicas de una molécula. El coeficiente de partición octanol-agua se define como la relación entre las concentraciones en el equilibrio de una sustancia disuelta en un sistema bifásico consistente en dos disolventes ampliamente inmiscibles²⁷⁷. En este caso n-octanol y agua.

$$P = \frac{C_{n\text{-octanol}}}{C_{\text{agua}}}$$

Ya que los valores de P pueden oscilar entre varios órdenes de magnitud, se suele usar su logaritmo (log P) por conveniencia.

La elección del n-octanol como disolvente no polar se basa en su comportamiento similar al de las membranas celulares en muchos aspectos:²⁷⁸ el n-octanol tiene una cadena alquílica saturada, un grupo hidroxilo que puede actuar como donador y aceptor de enlaces de hidrógeno y su parámetro de solubilidad ($\delta_{\text{octanol}} = 10$) es similar al de las membranas biológicas, por ejemplo las células epiteliales ($\delta = 10$). Esta combinación de cadenas lipofílicas, grupos hidrofílicos, capacidad de absorber moléculas de agua y parámetros de solubilidad dan al n-octanol propiedades muy similares a las de las membranas celulares.

²⁷⁷ L.G. Danielsson, Y.H. Zhang. "Methods for determining n-octanol-water partition constants". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 15:188-196, 1996.

²⁷⁸ R.N. Smith, C. Hansch, m.M. Ames. "Selection of a reference partitioning system for drug designing work". *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 64: 599-606, 1975.

Estas características han llevado a que el valor de log P sea ampliamente usado como parámetro físico-químico en estudios biológicos y farmacológicos. Así, es de gran importancia su determinación para estudios de acumulación de contaminantes en organismos,²⁷⁹ permeabilidad de compuestos en la piel²⁸⁰ o absorción de fármacos en el intestino o el cerebro²⁷⁵.

El cálculo teórico de log P.

Debido a la importancia de este parámetro y a la dificultad empírica de calcularlo, es necesario un método predictivo del log P que permita diseñar compuestos activos dentro del rango óptimo de lipofilia. Aunque la mayoría de estos métodos no incluyen efectos tales como la conformación molecular, la isomería Z/E o potenciales puentes de hidrógeno en sus cálculos, son amplia y comúnmente usados en la industria farmacéutica y agroquímica, ya que las medidas experimentales del valor de log P pueden ser difíciles, caras, consumir mucho tiempo o ser erróneas en el caso de sustancias hidrofóbicas.^{281,282}

Para el cálculo de los valores de log P, existen muchos métodos para su estimación^{283,284}. En la presente memoria se ha optado por usar un nuevo método, IALOGP²⁸⁵, basado en redes neuronales e índices electrotopológicos calculados mediante el programa informático MolconnZ²⁸⁶ para representar la estructura molecular que mejora el método clásico de Leo y Hansch (CLOGP)²⁸³. Este último empieza a quedarse obsoleto debido a que su base de datos es limitada y la predicción falla si el fragmento a adicionar no existe o el compuesto es totalmente nuevo.²⁸⁷

En la tabla 79 se comparan los valores de logP calculados mediante IALOGP y CLOGP para los capsaicinoides y capsinoides sintetizados.

A la vista de la tabla 79 se observa que existen diferencias bastante acusadas entre los valores de IALOGP y de CLOGP, siendo los valores de IALOGP bastante superiores a los de CLOGP, tanto para capsaicinoides como para capsinoides (en torno a 2-3 órdenes de magnitud). De todas formas se observa que al aumentar la longitud de la cadena lateral, el valor de log P va aumentando en ambos casos, como cabe esperar.

²⁷⁹ A.M. Kipopoulou, E. Manoli, C. Samara. "Bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables grown in an industrial area". Environmental Pollution, 106 : 369-380, 1999.

²⁸⁰ M.T.D. Cronin, J.C. Dearden, G.P. Moss, G. Murray-Dickson. "Investigation of the mechanism of flux across human skin in vitro by quantitative structure-permeability relationships". European Journal of Pharmaceutical Sciences, 7: 325-330, 1999.

²⁸¹ A. Kristl, S. Pecar, V. Kmetec. "Are calculated log P values for some guanine derivatives by different computer programs reliable?". International Journal of Pharmaceutics, 181: 219-226, 1999.

²⁸² A. Finizio, M. Vighi, D. Sandroni. "Determination of n-octanol/water partition coefficient (Kow) of pesticide critical review and comparison of methods". Chemosphere, 34: 131-161, 1997.

²⁸³ C. Hansch, A.J. Leo. "Substituent constant for correlation analysis". En Chemistry and Biology, Willey, New York, USA, 1979.

²⁸⁴ G. Klopman, K. Namboodiri, M. Schochet. "Simple method of computing the partition coefficient". Journal of Computational Chemistry, 6: 28-38, 1985.

²⁸⁵ IALOGP, Interactive Analysis, Belford, MA, USA, 2000.

²⁸⁶ MOLCONN-Z 3.50, Edusoft, L.C., Virginia, USA, 2003.

²⁸⁷ M. Parham, L. Hall, L. Kier. "Accurate prediction of Log P using E-State indices with neural network analysis". Poster Presentation, American Chemical Society Meeting, Washington, D.C., 2000.

Capsaicinoide	IALOGP	CLOGP	Capsinoide	IALOGP	CLOGP
N2C	0,94	-1,79	O2C	1,26	-1,14
N3C	1,3	-1,16	O3C	1,71	-0,51
N4C	1,73	-0,77	O4C	2,18	-0,12
N5C	2,17	-0,37	O5C	2,66	0,28
N6C	2,64	0,03	O6C	3,17	0,68
N7C	3,12	0,42	O7C	3,7	1,07
N8C	3,62	0,82	O8C	4,24	1,47
N9C	4,12	1,21	O9C	4,79	1,86
N10C	4,62	1,61	O10C	5,34	2,26
N11C	5,12	2,01	O11C	5,9	2,66
N12C	5,61	2,4	O12C	6,44	3,05
N13C	6,09	2,8	O13C	6,97	3,45
N14C	6,56	3,2	O14C	7,47	3,85
N16C	7,45	3,99	O16C	8,4	4,64
C	3,87	1,29	Cto	4,6	1,94
DHC	4,33	1,55	DHCto	5,16	2,2

Tabla 79: Valores de IALOGP y de CLOGP para los capsaicinoides y capsinoides sintetizados.

En resumen, se han sintetizado 16 capsaicinoides y 16 capsinoides con diferente longitud de cadena lateral, para modificar la lipofilia de la molécula. Estos capsaicinoides y capsinoides han sido seleccionados para cubrir un amplio rango de valores de log P, en un suave incremento desde valores próximos a 1 (IALOGP) hasta valores en torno a 8 (IALOGP), además de pertenecer todos ellos a dos familias de compuestos similares. Entre estos 32 compuestos, están presentes 2 capsaicinoides naturales (capsaicina y dihidrocapsaicina) y 2 capsinoides naturales (capsiato y dihidrocapsiato), que presentan valores de IALOGP intermedios entre todos los capsinoides y capsaicinoides sintetizados. Se sabe, como anteriormente se ha comentado, que tanto los capsaicinoides como los capsinoides naturales presentan unas marcadas propiedades biológicas.

En el estudio que se ha planteado se piensa correlacionar la actividad que poseen los capsaicinoides y capsinoides sintetizados en función de su lipofilia (longitud de cadena lateral) y comparar estos resultados con la lipofilia que presentan los capsaicinoides y capsinoides naturales. Se pretende comprobar que los capsaicinoides y capsinoides con una lipofilia similar a la de los capsaicinoides y capsinoides naturales son los que muestran unas propiedades biológicas más acusadas, en detrimento de aquellos que presentan valores de lipofilias superiores o inferiores a la de los compuestos que aparecen en la naturaleza.

A los 32 compuestos sintetizados se les han realizado bioensayos sobre meristemos apicales de trigo para determinar la correlación estructura-actividad al modificar la lipofilia de la molécula.

IV. 3. 4. 3. Bioensayos.

Introducción.

La realización de ensayos de bioactividad o bioensayos es fundamental en todo trabajo centrado en la búsqueda de productos naturales con actividad biológica, ya que el bioensayo es la herramienta que permite establecer, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo, la actividad de los productos obtenidos y que, en última instancia, permite establecer tanto los modos de acción como las relaciones estructura-actividad.

El término de bioensayo fue definido por Webster como “el uso de material biológico que sirva para evaluar la actividad de una sustancia comparada con otra estándar de actividad conocida”²⁸⁸. De una manera esquemática, un bioensayo consiste en aplicar un determinado producto sobre una especie receptora, observándose los cambios producidos con respecto a una muestra control o blanco (réplica en la que el producto no está presente).

El tipo de bioensayo a emplear depende de los compuestos que se van a evaluar, de las especies a tratar y del entorno físico-químico que se quiera ensayar.

En la presente memoria se someterá a los capsaicinoides y capsinoides sintetizados a un ensayo general de bioactividad (coleoptilos etiolados) que, de forma sencilla y rápida, debe indicar el rango de actividad, si la hay, de la colección de compuestos ensayados.

Bioensayo sobre meristemos apicales de trigo (*Triticum aestivum* L.).

Este tipo de bioensayo fue originalmente puesto a punto para evaluar la actividad como reguladores del desarrollo vegetal de las auxinas,^{289,290} aunque más recientemente ha sido usado para detectar actividades farmacológicas en productos químicos, uso para el que está ampliamente contrastado^{291,292}. Se realiza sobre segmentos de 4 mm de los meristemos apicales de trigo seccionados por debajo de los 2 primeros mm, lo que asegura que estén formados por tejidos indiferenciados, y permite evaluar de forma sencilla, rápida y reproducible la actividad sobre la elongación celular.

²⁸⁸ S. Webster. “*New Collegiate Dictionary*”. Merriam, C. Co. Springfield, 1980.

²⁸⁹ C.R. Hancock, H.W. Barlow, H.J. Lacey. “*The east malling coleoptile straight growth test method*”. *Journal of Experimental Botany*, 15: 166-176, 1964.

²⁹⁰ J.P. Nitsch, C. Nitsch. “*Studies on the growth of coleoptile and first internode sections. A new, sensitive, straight-growth test for auxins*”. *Plant Physiology*, 31: 94-100, 1956.

²⁹¹ H.G. Cutler. “*A fresh look at the wheat coleoptile bioassay*”. *Proceedings of the 11th Annual Meeting of the Plant Growth Regulator Society of America*, 1-9, 1984.

²⁹² F.A. Macias, R.F. Velasco, D. Castellano, J.C.G. Galindo. “*Application of Hansch’s model to guaianolide ester derivatives: a quantitative structure-activity relationship study*”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 3530-3539, 2005.

Este bioensayo permite únicamente discriminar entre productos bioactivos o inactivos, acotando el rango de concentraciones a emplear. Además, con respecto al objetivo de este apartado, centrado en el estudio de la influencia de la lipofilia, su uso representa claras ventajas a la hora de evaluar la capacidad de cruzar las membranas celulares, puesto que en este sistema los fenómenos de transporte no deberían verse enmascarados por otras características morfológicas del receptor.

Los coleótilos etiolados fueron obtenidos después de tres días de germinación de trigo (*Triticum aestivum* L.) en placas Petri de 15 cm de diámetro en las que se ponen un papel de filtro Whatman nº 1 en la base, como sustrato. Una vez puesto el papel, se adiciona sobre la placa Petri en torno a unas 100 semillas de trigo y posteriormente se adicionan 15 mL de agua destilada. Las placas Petri que se ponen a germinar son recubiertas de papel de aluminio para que permanezcan en absoluta oscuridad. El trigo germinó a 25 °C en una cámara de temperatura controlada Memmert ICE 700, en ausencia de luz.

Transcurridos los tres días de germinación, se sacan las placas Petri de la cámara y se procede a la obtención de los coleótilos del trigo. Se seleccionan los mejores coleótilos y se procede a seccionar segmentos de 4 mm de los meristemos apicales del trigo por debajo de los 2 primeros mm, lo que asegura que estén formados por tejidos indiferenciados. Todo esto se realiza bajo luz verde para impedir que se produzca diferenciación celular. Las porciones de 4 mm cortadas se mantienen en una disolución acuosa tamponada hasta que se introducen en los tubos de ensayo.

En este bioensayo, los productos a ensayar se disuelven a distintas concentraciones (desde 1000 µM a 10 µM) en disoluciones acuosas tamponadas (tampón ácido cítrico-fosfato, pH 5,6) enriquecidas con sacarosa al 2 % y con un 0,5 % de dimetil sulfóxido (DMSO) para mejorar la solubilidad de los compuestos. En tubos de ensayo de 10 mL se ponen en contacto 2 mL de cada disolución con 5 coleótilos etiolados de trigo de 4 milímetros de longitud y se mantienen en agitación por rotación a 6 rpm y en ausencia de luz a 30 °C de temperatura durante 24 horas. Se realizaron tres réplicas por disolución con cada producto.

Una vez finalizado el bioensayo, los coleótilos de cada tubo se disponen sobre una plantilla negra, donde se fotografían digitalmente, midiendo la longitud de los mismos mediante la digitalización de sus imágenes²⁹³. Los datos obtenidos se analizan estadísticamente. El parámetro que se evalúa es el incremento de la longitud del coleótilo etiolado y el nivel de actividad se expresa en diferencias de porcentaje del incremento provocado por los productos ensayados respecto al generado por el control (solución acuosa tamponada). Valores mayores que cero significan efecto estimulador y valores menores, efecto inhibidor.

²⁹³ D. Castellano, F.A. Macías, M. Castellano, R.M. Cambronero. FITOMED (Automated System for Measurement of Variable Lengths). Sp. Patent P9901565

IV. 3. 4. 4. Discusión de los resultados: análisis de la relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR).

El estudio de la relación estructura-actividad constituye un paso fundamental en el diseño de un compuesto activo por su enorme potencial a la hora de racionalizar el comportamiento de una colección de compuestos. Estos estudios conllevan dos facetas.²⁹⁴

La primera es la posibilidad de que pueda hallarse esta relación entre un cambio estructural sistemático en una serie de moléculas y las variaciones en la actividad biológica observada. Esto lleva directamente a una explicación de los cambios biológicos advertidos en la serie, expresada en términos de estructura química.

La segunda faceta de un QSAR se aprecia cuando se ha obtenido cierto éxito en el esfuerzo anterior. Consiste en la posibilidad de que pueda usarse como esquema predictivo en el diseño de moléculas nuevas y más eficaces, bien sea aumentando su actividad o bien disminuyendo sus efectos secundarios.

Básicamente un QSAR consiste en un intento de correlacionar propiedades estructurales, físicas o químicas con la actividad, a menudo expresada en términos de IC_{50} y requiere de herramientas eficaces para el cálculo de ambos parámetros, IC_{50} y $\log P$, como es el caso de la presente memoria.

Cálculo de IC_{50} .

Con los datos de actividad obtenidos durante el ensayo sobre los coleoptilos etiolados de trigo y con el objeto de evaluar la posible relación existente entre la actividad y la lipofilia, se realizó el cálculo de los valores de IC_{50} mediante la transformación matemática en una función sigmoideal de dosis-respuesta de pendiente constante.²⁹⁵

Una curva de dosis-respuesta estándar viene definida por 4 parámetros: la respuesta mínima observada (mínimo), la respuesta máxima medida (máximo), la pendiente y la concentración del compuesto ensayado que provoca el 50 % del efecto obtenido. El valor de IC_{50} es la concentración que corresponde con la mitad del efecto global obtenido. De esta manera, si la mínima respuesta obtenida es del 20 % y la máxima del 100 %, el valor de IC_{50} viene dado por la concentración que se corresponde con el 60 %. Por lo tanto los valores de IC_{50} vienen expresados en concentración.

²⁹⁴ L.B. Kier, M.S. Tute. "Aspectos teóricos en el diseño de fármacos" en Principios de Química Farmacéutica, Foye, W.O. (Ed.), Ed. Reverte, S.A., España, 1984.

²⁹⁵ PRISMA 4.0; GraphPad Software, INC.: San Diego, CA, 2003.

IV. 3. 4. 1. Análisis de la relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR) para Capsaicinoides.

Ya se ha comentado anteriormente que se han sintetizado una serie de análogos de los capsaicinoides con distintas longitudes de cadenas lineales (C2-C16) realizándose por tanto amidaciones del clorhidrato de la 4-hidroxi-3-metoxibencilamina con los cloruros de acilo de estos ácidos lineales anteriormente comentados.

La lipofilia de los capsaicinoides sintetizados ha ido incrementándose a medida que se han añadido cadenas laterales de mayor longitud. Por lo tanto, se han obtenido una serie de capsaicinoides que presentan un amplio abanico de valores de Log P, siendo los valores de Log P de los capsaicinoides naturales (capsaicina y dihidrocapsaicina) intermedios entre todos los que se han sintetizado.

Como ya se comentó, los valores de IC₅₀ han sido calculados mediante un modelo de dosis-respuesta sigmoide de pendiente constante a partir de los valores de actividad obtenidos en el ensayo de coleoptilos del trigo para los capsaicinoides ensayados. Estos valores de IC₅₀ vienen expresados en mol/L.

En la tabla 80 se presentan las características químicas y los resultados obtenidos de los capsaicinoides sintetizados.

Muestra	IA Log P	IC ₅₀ * 10 ³ (mol/L)	Log (1/IC ₅₀)	AEH	DEH	PM
N2C	0,94	2,774	2,5569	4	2	195
N3C	1,3	1,408	2,8514	4	2	209
N4C	1,73	0,645	3,1902	4	2	223
N5C	2,17	0,728	3,1379	4	2	237
N6C	2,64	0,385	3,4146	4	2	251
N7C	3,12	0,265	3,5770	4	2	265
N8C	3,62	0,197	3,7051	4	2	279
C	3,87	0,188	3,7251	4	2	305
N9C	4,12	0,223	3,6525	4	2	293
DHC	4,33	1,080	2,9666	4	2	307
N10C	4,62	0,252	3,5979	4	2	307
N11C	5,12	0,222	3,6527	4	2	321
N12C	5,61	0,161	3,7937	4	2	335
N13C	6,09	0,625	3,2041	4	2	349
N14C	6,56	0,714	3,1460	4	2	363
N16C	7,45	4,062	2,3912	4	2	391

Tabla 80: Características químicas y resultados obtenidos de los capsaicinoides sintetizados. AED (aceptores enlaces-H); DEH (aceptores enlaces-H); PM (peso molecular).

Para llevar a cabo este estudio se procedió a la correlación de los valores de IALogP y de IC₅₀ expresados en la forma [Log (1/IC₅₀)] para los 16 capsaicinoides que se han ensayado. Se ha realizado un ajuste lineal, logarítmico y polinómico de orden 2. Los valores obtenidos se han ajustado muy bien a un ajuste polinómico de orden 2, mediante una ecuación de segundo orden (ecuación 1). Se ha observado que los productos DHC y N12C no se han ajustado bien a la ecuación 1, por lo que han sido desechados a la hora del cálculo de dicha ecuación.

$$\text{Ecuación 1: } \text{Log (1/IC}_{50}) = -0.1108 (\text{IALog P})^2 + 0.9109 (\text{IALog P}) + 1.8213$$

La ecuación obtenida ha presentado un excelente coeficiente de correlación ($r^2 = 0,9696$) para 14 muestras ($n = 14$). Estos resultados son altamente significativos desde un punto de vista biológico. Estos valores de actividad vienen representados en la figura 64.

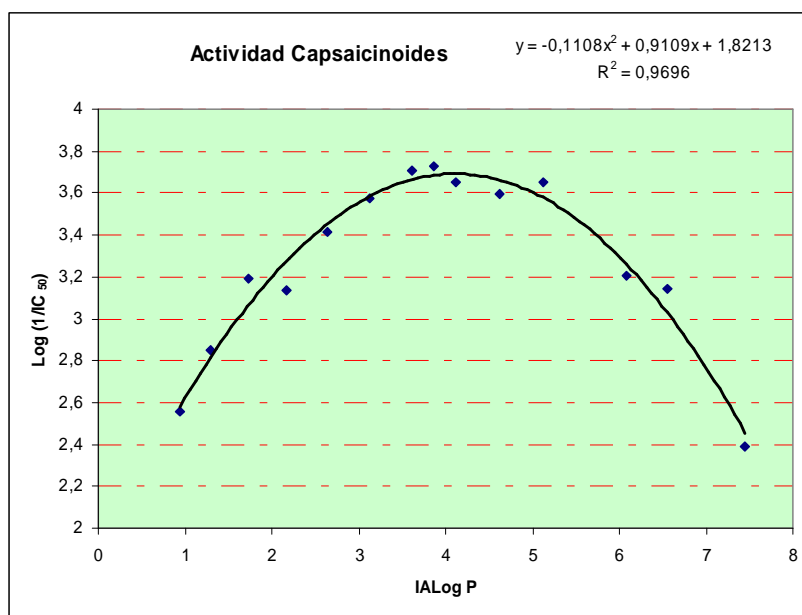


Figura 64: Representación del IALog P vs. Log (1/IC₅₀) para los capsaicinoides sintetizados.

A la vista de la figura 64, se observa que el capsaicinoide que presenta una mayor actividad es la capsaicina, que es el capsaicinoide mayoritario que aparece en la naturaleza. También han presentado excelentes valores de actividad el N8C y el N9C, capsaicinoides que tienen valores de lipofilia muy similares que la capsaicina. A medida que nos alejamos de valores de lipofilias (Log P) similares a los de la capsaicina, bien si estos valores son superiores o inferiores, observamos que las propiedades biológicas de los compuestos sintetizados van disminuyendo.

Se observa por tanto (figura 64) que los capsaicinoides naturales (capsaicina) debido seguramente a sus propiedades de lipofilia, son los capsaicinoides que presentan mayor actividad. Capsaicinoides con lipofilias mayores o menores que los naturales disminuyen en sus propiedades biológicas, seguramente porque no son capaces de penetrar tan fácilmente las membranas biológicas de las células para desarrollar su acción.

Capsaicinoides sintéticos con valores de lipofilia similares que la capsaicina (N8C y N9C) presentan actividades semejantes que ésta. Este hecho es de enorme importancia, ya que se pueden obtener capsaicinoides sintéticos como N8C y N9C, con propiedades similares que los naturales (capsaicina), pero que económicamente son mucho más fáciles de sintetizar requiriendo de un menor número de pasos y materias primas más económicas. Esto a la hora de la aplicabilidad de los capsaicinoides en la industria (alimentaria o farmacéutica) supone una gran ventaja, ya que se tiene la posibilidad de obtener capsaicinoides similares a los naturales, con propiedades biológicas comparables y a un reducido precio.

IV. 3. 4. 4. 2. Análisis de la relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR) para Capsinoides.

Ya se ha comentado anteriormente que se han sintetizado una serie de análogos de los capsinoides, al igual que se hizo con los capsaicinoides, con distintas longitudes de cadenas lineales (C2-C16) realizándose esterificaciones al alcohol vanílico con los cloruros de acilo de los ácidos lineales anteriormente comentados, además de haberse sintetizado dos capsinoides naturales (capsiato y dihidrocapsiato).

La lipofilia de los capsinoides sintetizados ha ido incrementándose a medida que se han añadido cadenas laterales de mayor longitud. Por lo tanto, se han obtenido una serie de capsinoides que presentan un amplio abanico de valores de Log P, siendo los valores de Log P de los capsinoides naturales (capsiato y dihidrocapsiato) intermedios entre todos los que se han sintetizado.

En la tabla 81 se presentan las características químicas y los resultados obtenidos de los capsinoides sintetizados.

Muestra	IALog P	IC ₅₀ * 10 ³ (mol/L)	Log (1/IC ₅₀)	AEH	DEH	PM
O2C	1,26	3,638	2,4391	4	1	196
O3C	1,71	2,835	2,5474	4	1	210
O4C	2,18	1,170	2,9318	4	1	224
O5C	2,66	1,210	2,9172	4	1	238
O6C	3,17	0,601	3,2210	4	1	252
O7C	3,7	0,386	3,4132	4	1	266
O8C	4,24	0,356	3,4487	4	1	280
Cto	4,6	0,517	3,2863	4	1	306
O9C	4,79	0,186	3,7305	4	1	294
DHCto	5,16	0,220	3,6570	4	1	308
O10C	5,34	0,181	3,7423	4	1	308
O11C	5,9	0,309	3,5100	4	1	322
O12C	6,44	0,467	3,3305	4	1	336
O13C	6,97	0,559	3,2527	4	1	350
O14C	7,47	2,433	2,6138	4	1	364
O16C	8,4	2,451	2,61066	4	1	392

Tabla 81: Características químicas y resultados obtenidos de los capsinoides sintetizados. AED (aceptores enlaces-H); DEH (aceptores enlaces-H); PM (peso molecular).

Como ya se comentó, los valores de IC_{50} han sido calculados mediante un modelo de dosis-respuesta sigmoide de pendiente constante a partir de los valores de actividad obtenidos en el ensayo de coleptilos del trigo para los capsinoides ensayados. Estos valores de IC_{50} vienen expresados en mol/L.

Para llevar a cabo este estudio se procedió a la correlación de los valores de $I\text{ALog}P$ y de IC_{50} expresados en la forma $[\text{Log}(1/IC_{50})]$ para los 16 capsinoides que se han sintetizado. Se ha realizado un ajuste lineal, logarítmico y polinómico de orden 2. Los valores obtenidos se han ajustado muy bien a un ajuste polinómico de orden 2, mediante una ecuación de segundo orden (ecuación 2). Se ha observado que los productos capsiato (Cto) y O14C no se han ajustado bien a la ecuación 2, por lo que han sido desechados a la hora del cálculo de dicha ecuación.

$$\text{Ecuación 2: } \text{Log}(1/IC_{50}) = -0.0881 (I\text{ALog}P)^2 + 0.8919 (I\text{ALog}P) + 1.3394$$

La ecuación obtenida ha presentado un excelente coeficiente de correlación ($r^2 = 0,9521$) para 14 muestras ($n = 14$). Estos resultados son altamente significativos desde un punto de vista biológico. Estos valores de actividad vienen representados en la figura 65.

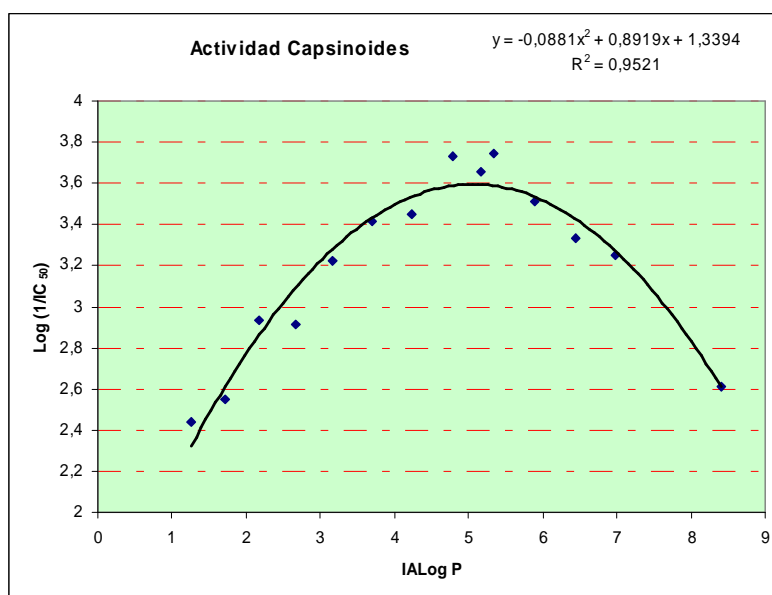


Figura 65: Representación del $I\text{ALog}P$ vs. $\text{Log}(1/IC_{50})$ para los capsinoides sintetizados.

A la vista de la figura 65, se observa que los capsinoides que han presentado una mayor actividad han sido el O9C, el O10C y el capsainoide natural dihidrocapsiato (DHCto). Los capsinoides O9C y O10C tienen valores de lipofilia ($\text{Log}P$) similares a los de los capsinoides naturales, como el dihidrocapsiato, el cual ha dado muy buenos resultados. Se puede observar además que a medida que nos alejamos de valores de lipofilia ($\text{Log}P$) similares a estos tres compuestos, bien si estos valores son superiores o inferiores, las propiedades biológicas de los compuestos sintetizados van disminuyendo.

Se observa por tanto (figura 65) que los capsinoides naturales (dihidrocapsiato) debido seguramente a sus propiedades de lipofilia, son los capsinoides que presentan mayor actividad. Capsinoides con lipofilias mayores o menores que los naturales disminuyen en sus propiedades biológicas, seguramente porque no son capaces de penetrar tan fácilmente las membranas biológicas de las células para desarrollar su acción.

Al igual que se comentó para los capsaicinoides, se ha obtenido que capsinoides sintéticos (O9C y O10C) con valores de lipofilia similares a los capsinoides naturales (dihidrocapsiato), presentan propiedades biológicas similares. Esto tiene una enorme importancia, y es que se puede disponer de capsinoides sintéticos análogos de los naturales, con sus mismas propiedades biológicas, pero sintetizados fácilmente en el laboratorio a bajo precio. Esto cobra una mayor importancia en el caso de los capsinoides, que a pesar de ser compuestos naturales que aparecen en los pimientos, son muy pocas las variedades de pimientos que poseen este tipo de compuestos, por lo tanto para beneficiarnos de las propiedades de los capsinoides habría que tomarlos a partir de aquellos que hayan sido sintetizados en el laboratorio.

IV. 3. 4. 5. Conclusiones.

A la vista de los resultados obtenidos, se ha comprobado que de entre todos los capsaicinoides y capsinoides ensayados, los capsaicinoides y capsinoides naturales, además de aquellos sintéticos que tienen unos valores de lipofilia similares a los naturales, son los que han presentado unas mayores actividades biológicas. Si nos alejamos de estos valores de lipofilia, bien por arriba o por abajo, las propiedades biológicas de estos compuestos van disminuyendo paulatinamente.

Esto hace pensar que la naturaleza a lo largo de millones de años de evolución ha logrado crear, tanto en las plantas como en los animales, moléculas con la máxima actividad para que puedan desarrollar su acción. Este ha sido el caso de los capsaicinoides y capsinoides, en donde se observa muy claramente como la planta del pimiento es capaz de sintetizar los capsaicinoides más potentes y con las mejores propiedades físico-químicas para que puedan desempeñar su función.

Respecto a las propiedades biológicas que presentan entre si los capsaicinoides y los capsinoides, se observa (figuras 64 y 65) que ambas familias de compuestos presentan propiedades biológicas similares. Ambas familias de compuestos presentan valores de inhibición del crecimiento de los coleóptilos similares en los productos de mayor actividad. La única diferencia observable entre los capsaicinoides y los capsinoides, es que mientras que con los primeros, la máxima actividad la han dado además de la capsaicina, los capsaicinoides de 8 y 9 átomos de carbono en la cadena lateral ($3,62 < \text{IALogP} < 4,12$), en los capsinoides la máxima actividad la han tenido los de 9 y 10 átomos de carbono en la cadena lateral ($4,79 < \text{IALogP} < 5,34$).

También ha resultado muy interesante como resultado de este trabajo, que se pueda disponer de capsaicinoides y capsinoides sintéticos, con valores de lipofilia y con propiedades similares a las de los naturales, pero que se pueden sintetizar muy fácilmente en el laboratorio. La síntesis de los capsaicinoides y capsinoides naturales también puede

ser llevada a cabo químicamente, pero la naturaleza de sus cadenas laterales (metilos terminales y dobles enlaces) hace que su síntesis se complique y se encarezca en exceso. El que se tenga la posibilidad de obtener estos compuestos análogos mucho más fácilmente y a un menor precio, hace a estos productos ser muy interesantes para su aplicación tanto en la industria alimentaria como en la farmacéutica.

IV. 4 APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS DESARROLLADAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CAPSAICINOIDES EN PIMIENTOS Y ALIMENTOS.

En este capítulo se aplicarán las metodologías cromatográficas y de extracción desarrolladas en los capítulos IV.1 y IV.2 de la presente tesis doctoral para la consecución de varios objetivos:

- Estudio de la evolución del contenido en capsaicinoides en pimientos a lo largo de la maduración del fruto, tanto en periodos iniciales de crecimiento de la planta, como en la planta adulta.
- Cuantificación de los capsaicinoides presentes en distintas variedades de pimientos picantes cultivados y comercializados en España.
- Cuantificación de los capsaicinoides presentes en alimentos elaborados a partir de pimientos picantes, como salsas picantes, pimientos secos molidos, ketchups picantes, etc.

Con este capítulo se pretende dar una aplicación práctica a las metodologías cromatográficas y de extracción que se han desarrollado durante el trabajo realizado.

IV. 4. 1. Estudio de la evolución del contenido en capsaicinoides en pimientos a lo largo de la maduración del fruto.

Introducción.

En este apartado de la tesis doctoral se ha pretendido realizar el estudio de la evolución en el contenido en capsaicinoides que presentan los pimientos picantes. Como se ha comentado en los antecedentes bibliográficos de la presente tesis doctoral, existen trabajos sobre la evolución que presentan estos compuestos a lo largo de la maduración del pimiento. También existen estudios sobre la concentración de estos compuestos en pimientos procedentes de distintas partes de la planta.

De todas formas aun no existen estudios comparativos sobre la evolución en el contenido en capsaicinoides que presentan los pimientos en plantas jóvenes o en éstas mismas plantas siendo más adultas. Este es el trabajo que se ha pretendido desarrollar en este apartado, además de comparar la producción de capsaicinoides que presentan distintas variedades de pimientos que son cultivadas en España.

Se pretende además dar al agricultor información sobre el contenido en capsaicinoides de variedades a plantar, así como estimar el periodo óptimo de recolección del pimiento en función del nivel de capsaicinoides requeridos.

IV. 4. 1. 1. Cultivo de los pimientos.

El cultivo de los pimientos se ha llevado a cabo en un invernadero del Centro de Investigación y Formación Agraria (CIFA) de Chipiona, dependiente del Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA) perteneciente a la Junta de Andalucía. Se han sembrado tres variedades de pimientos cultivadas en España, como son el pimiento Bolilla (*Capsicum annuum*), pimiento Extra Picante (*Capsicum annuum*) y pimiento Cayena (*Capsicum frutescens*). Las tres variedades de pimientos han sido sembradas en semilleros en el mes de septiembre, siendo transplantadas al invernadero en noviembre. Las plantas del pimiento han sido regadas mediante el sistema de goteo, con agua enriquecida en nutrientes.

El abonado de fondo del invernadero (15 x 70 m) antes de la siembra de los pimientos ha sido el siguiente:

- 20 Kg de sulfato de magnesio.
- 15 Kg de superfosfato de cal.
- 20 Kg de sulfato potásico.
- 20 Kg de sulfato amónico.

Una vez sembradas las plantas de los pimientos, se ha utilizado un abonado de fertirrigación (tabla 81). Este abonado ha dependido del estado de desarrollo de la planta.

Fenología	Quincena	Riego (m ³ /ha)	N (Kg/ha)	P ₂ O ₅ (Kg/ha)	K ₂ O (Kg/ha)	CaO (Kg/ha)	MgO (Kg/ha)
Desarrollo vegetativo	1 ^a	105	8	6	8	2	2
	2 ^a	240	8	6	8	2	2
Floración/Fructificación	3 ^a	350	8	6	8	2	2
	4 ^a	380	8	6	8	2	2
Engorde/Maduración	5 ^a	340	15	15	20	7	2
	6 ^a	255	15	15	20	7	2
Plena producción	7 ^a	200	23	16	33	11	7
	8 ^a	200	25	15	35	14	9
	9 ^a	180	25	15	35	14	9
	10 ^a	170	25	15	35	14	8
	11 ^a	165	25	10	35	7	8
	12 ^a	170	25	10	35	7	8
	13 ^a	185	25	10	35	7	8
	14 ^a	210	25	10	35	7	8
	15 ^a	225	25	0	35	7	8

Tabla 81: Abonado de fertirrigación aplicado en el estudio.

La temperatura del invernadero ha estado controlada. En los meses de invierno, a temperaturas inferiores de 10 °C se activaba un sistema de calefacción, haciendo que la temperatura no bajara de este nivel. En épocas de calor las paredes del invernadero eran levantadas para permitir la renovación del aire y no permitir un calentamiento excesivo del mismo (35-40 °C).

Cabe destacar que durante todo el periodo de crecimiento y maduración de la planta, el invernadero ha sufrido una plaga de mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum*). Los daños directos de esta plaga (amarilleamientos y debilitamiento de las plantas) son ocasionados por larvas y adultos al alimentarse absorbiendo la savia de las hojas. Los daños indirectos se deben a la proliferación de negrilla sobre la melaza producida en la alimentación, manchando y depreciando los frutos y dificultando el normal desarrollo de las plantas.

Algunas variedades de pimientos se han visto mas afectadas por esta plaga que otras, como se comenta posteriormente. Esto ha hecho que las fumigaciones para controlar dicha plaga hayan sido bastante frecuentes.

Seguimiento de la maduración.

La maduración de los pimientos picantes se ha seguido mediante la colocación de lazos de lana de diversos colores a los pimientos cuando éstos estaban empezando a nacer, justamente tras la floración. De esta manera, al ser recolectados los pimientos, dependiendo del color del lazo que posee cada uno, se puede saber la edad que presentan.

Las plantas empezaron a florecer a principios de enero de 2006. A partir de esta fecha se han ido poniendo lazos de distintos colores a los nuevos pimientos que iban naciendo, con un espaciado temporal de 10 días. La primera recolección se ha llevado a cabo el día 28 de abril (planta de ≈ 7 meses de edad), considerándose a estos pimientos como los procedentes de la planta joven. La segunda recolección de pimientos se ha llevado a cabo el 6 de julio, siendo estos pimientos los considerados procedentes de la planta adulta ($\approx 9,5$ meses). A partir de esta fecha la planta dejó de producir pimientos, por lo que se finalizó el seguimiento de muestreo.

IV. 4. 1. 2. Metodología empleada para el estudio.

Durante el estudio de la evolución en el contenido en capsaicinoides, se ha estudiado por separado el pimiento y la placenta del pimiento Bolilla y del pimiento Extra Picante. Del pimiento Cayena se ha estudiado solamente el pimiento, al no presentar esta variedad placenta. Se han estudiado dos estados de vejez de la planta, y en cada estado de vejez, 11 periodos de maduración. Además todos los ensayos se han llevado a cabo por duplicado. Esto en conjunto ha requerido de un gran número de extracciones, lo que conlleva un gran número de análisis cromatográficos a realizar.

Como se ha discutido en el capítulo IV.2. de resultados, el método de extracción de capsaicinoides más apropiado para la extracción de un gran número de muestras cuando las muestras son muy similares entre sí, es la **extracción asistida por ultrasonidos (EAU)**. Esta es la técnica que se ha empleado a la hora de realizar el estudio de la evolución de los capsaicinoides, debido al gran número de muestras que se tenían que analizar. El baño de ultrasonidos disponible para la EAU permite incluso realizar hasta 12 extracciones simultáneamente, teniendo esta técnica el menor tiempo de extracción por muestra, presentando una elevada reproducibilidad y repetibilidad en los análisis (capítulo IV.2.1.).

Una vez decidida la técnica de extracción a emplear, faltaba por decidir que método cromatográfico de los dos desarrollados (columna C-18 convencional y columna monolítica) se iba a utilizar. La decisión también fue tomada basándose en el gran número de muestras que se tenían que analizar, más aún cuando el equipo de CLAE debía de ser compartido por otros usuarios. De tal forma se decidió emplear el método desarrollado con la columna monolítica **Chromolith Performance RP-18e** (100 mm x 4,6 mm). Este método permite realizar dos análisis a la hora frente a un único análisis que se puede realizar si se emplea una columna de C-18 convencional, tal como se comenta en el apartado IV.1 de resultados.

Una vez decidido el método de extracción y el método cromatográfico a emplear se procedió a la realización del estudio del contenido total en capsaicinoides a lo largo de la maduración. Los pimientos una vez recolectados del invernadero, separados y clasificados

según su maduración, fueron pelados, separándoles el pimiento de la placenta, y desechando las pepitas y el pedúnculo. El pimiento y la placenta fueron triturados y homogeneizados por separado mediante una batidora convencional. Una vez obtenida una muestra homogénea, los pimientos han sido conservados a una temperatura de -32 °C hasta su posterior análisis.

Todo esto, como se ha comentado anteriormente se ha llevado a cabo con el pimiento Extra Picante (*Capsicum annuum*), pimiento Bolilla (*Capsicum annuum*) y pimiento Cayena (*Capsicum frutescens*). Cabe destacar que el pimiento Cayena, no presenta apenas placenta, siendo extremadamente complicado separar pequeños hilillos, que realizan tal función, del resto del pimiento. Por tal motivo, con esta variedad de pimiento no se ha realizado la distinción entre pimiento y placenta, homogeneizando todo el fruto una vez que fueron separadas las pepitas y el pedúnculo.

Los resultados obtenidos para cada variedad de pimiento vienen recogidos y desarrollados a continuación.

IV. 4. 1. 3. Pimiento Extra Picante (*Capsicum annuum*).

Como se ha comentado anteriormente, se ha seguido la maduración del pimiento Extra Picante tanto en el inicio del crecimiento de la planta, como cuando la planta era adulta.

Las plantas del pimiento Extra Picante han tenido un crecimiento muy pronunciado, pero no han presentado una excesiva densidad foliar como las otras dos variedades cultivadas. Han alcanzado alturas en torno a 2 metros. Los pimientos Extra Picante presentan una forma alargada, picuda, alcanzando una longitud máxima comprendida entre 6 y 10 centímetros. Las plantas del pimiento Extra Picante se han visto menos afectadas por la plaga de la mosca blanca que las otras dos variedades de pimientos cultivadas en el invernadero. Esta variedad de pimiento ha sido muy productiva, produciendo mucha mayor cantidad de pimientos que el pimiento Bolilla.

Los resultados obtenidos en estos dos estados de la planta tanto para el pericarpio del pimiento como para la placenta vienen recogidos a continuación:

IV. 4. 1. 3. 1. Pimiento Extra Picante (pericarpio).

Planta joven.

El pimiento Extra Picante empezó a producir pimientos a fecha del 7 de enero de 2006. Las puestas de lazos que han servido para seguir la maduración de esta variedad de pimiento cuando la planta era aun joven vienen recogidas en la tabla 82.

Los pimientos Extra Picantes fueron recolectados el 28/04/2006. Así pues, los pimientos más jóvenes recolectados tenían 10 días de maduración en la planta. Se dejaron pimientos hasta estados de sobremaduración en la planta (M-9, M-10 y M-11). Los pimientos más viejos recolectados tenían una vejez de 110 días (M-11), encontrándose por

tanto en un estado de sobremaduración, con pérdida de agua y coloración roja muy intensa.

Nomenclatura	Fecha de la selección del fruto	Días de maduración del fruto en la recolección	Estado visual del fruto en la fecha de recolección
M-11	7/01/2006	110	Sobremaduración
M-10	17/01/2006	100	Sobremaduración
M-9	27/01/2006	90	Sobremaduración
M-8	6/02/2006	80	Color rojo
M-7	16/02/2006	70	Color rojo
M-6	27/02/2006	59	Color rojo
M-5	8/03/2006	50	Color rojo
M-4	17/03/2006	41	Color verde-rojo
M-3	28/03/2006	30	Color verde
M-2	7/04/2006	20	Color verde
M-1	17/04/2006	10	Color verde

Tabla 82: *Propiedades de los pimientos Extra Picantes recolectados en la primera etapa de maduración en la planta.*

Se han realizado estudios de la concentración de los capsaicinoides totales tanto en el pimiento propiamente dicho como en la placenta del mismo, viendo como se distribuye la concentración de capsaicinoides dentro del pimiento. Como ya se ha comentado en los antecedentes bibliográficos, la concentración de capsaicinoides en la placenta debe de ser bastante superior a la concentración que existe en el pimiento, ya que es en la placenta donde se sintetizan estos compuestos y donde se almacenan, pasando posteriormente al resto del pimiento e incluso a otras partes de la planta. Todos los ensayos han sido llevados a cabo por duplicado.

Respecto al pimiento, a la vista de la figura 66, en el que se representa una comparación en la concentración total de capsaicinoides en el pericarpio del pimiento en los dos estados de vejez de la planta estudiados, se observa que se produce un incremento en el contenido en capsaicinoides hasta el día 30 (M-3) de maduración del fruto, fecha a partir de la cual comienza a disminuir la concentración de estos compuestos hasta los 50 días (M-5) de maduración, donde se observa un mínimo de concentración. Esta disminución puede ser debida por el incremento en la actividad de las peroxidasas del pimiento, como se comentó en los antecedentes bibliográficos^{296,297,298}. A 60 días (M-6) de

²⁹⁶ M. Contreras-Padilla, E.M. Yahia. "Changes in capsaicinoids during development, maturation, and senescence of Chile peppers and relation with peroxidase activity". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46: 2075-2079, 1998.

²⁹⁷ M.A. Bernal, A.A. Calderón, M.A. Pedreño, R. Muñoz, A. Ros Barceló, F. Merino. "Capsaicin oxidation by peroxidase from *Capsicum annuum* (Var. *annuum*) fruits". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 41: 1041-1044, 1993.

²⁹⁸ M.A. Bernal, A.A. Calderón, M.A. Pedreño, R. Muñoz, A. Ros Barceló, F. Merino. "Dihydrocapsaicin oxidation by *Capsicum annuum* (var. *annuum*) peroxidase". Journal of Food Science, 58: 611-613, 1993.

maduración hay un incremento en la concentración total de capsaicinoides debido seguramente a que la acción de las peroxidasas no es tan intensa como a los 50 días (M-5). A partir de esta fecha se observa por lo general un descenso leve en la concentración de capsaicinoides.

Planta adulta.

Como se ha comentado con anterioridad, también se ha seguido la evolución del contenido en capsaicinoides de los pimientos cuando la planta ha sido ya adulta. El muestreo realizado viene descrito en la tabla 83.

Nomenclatura	Fecha de la selección del fruto	Días de maduración del fruto en la recolección	Estado visual del fruto en la fecha de recolección
M-11	17/03/2006	111	Sobremaduración
M-10	28/03/2006	100	Sobremaduración
M-9	7/04/2006	90	Sobremaduración
M-8	17/04/2006	80	Color rojo
M-7	27/04/2006	70	Color rojo
M-6	8/05/2006	59	Color rojo
M-5	17/05/2006	50	Color rojo
M-4	26/05/2006	41	Color verde-rojo
M-3	6/06/2006	30	Color verde
M-2	16/06/2006	20	Color verde
M-1	26/06/2006	10	Color verde

Tabla 83: *Propiedades de los pimientos Extra Picantes recolectados en la segunda etapa de maduración en la planta.*

Los pimientos han sido recolectados el 6/07/2006, por lo que los primeros pimientos recolectados presentaban una vejez de 10 días. A finales de junio y principio de julio, a pesar de que la planta seguía en floración, las flores, transcurridos unos días se secaban, no produciendo pimientos. Es por ello que se decidió acabar aquí el estudio de la maduración.

La evolución en el contenido en capsaicinoides para el pericarpio del pimiento, cuando la planta es adulta, viene recogida en la figura 66, en la que se representa además la evolución en el contenido total en capsaicinoides en el primer estado de vejez de la planta. Todos los ensayos han sido llevados a cabo por duplicado.

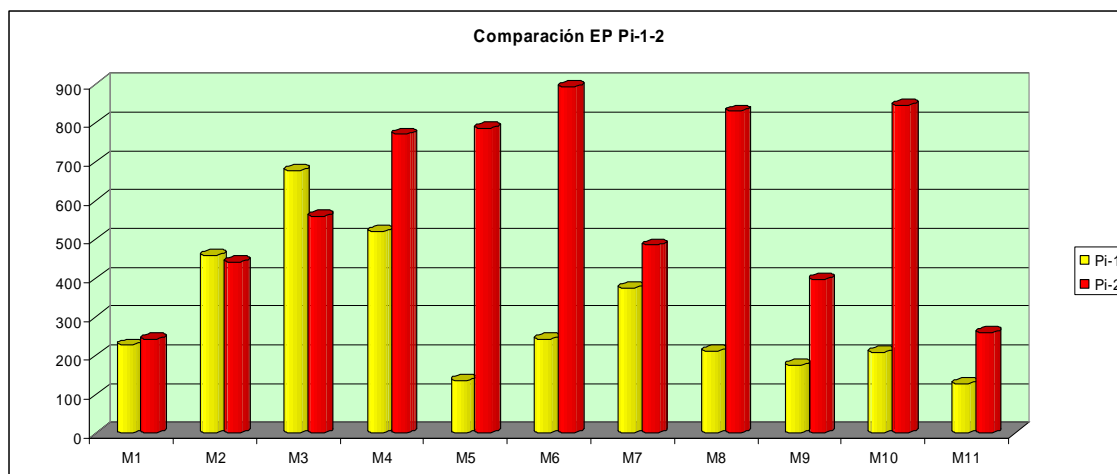


Figura 66: Comparación de los capsaicinoides totales ($\mu\text{mol/Kg}$) en el pimiento Extra Picante entre los dos periodos de maduración del fruto.

A la vista de la figura 66 se observa que se produce un incremento paulatino en la concentración de capsaicinoides totales presentes en el pimiento hasta el día 60 (M-6) de maduración del fruto. En el día 70 (M-7) de maduración se observa una bajada brusca en la cantidad de capsaicinoides totales debido seguramente a la acción de las peroxidasas. A partir de esta fecha la concentración en capsaicinoides totales no sigue ningún patrón determinado.

Comparación de la cantidad total de capsaicinoides en los dos estados de maduración (pericarpio).

Finalmente se ha realizado la comparación del contenido total de capsaicinoides para los dos estados de maduración en el pericarpio del pimiento. Esta comparación permitirá conocer si hay diferencias en el contenido en capsaicinoides según el estado de madurez de la planta.

Con respecto al pimiento, se observa (figura 66) que por lo general, la concentración de capsaicinoides totales es superior en el segundo periodo de maduración que en el primero, salvo en los primeros 30 días (M-3) de crecimiento del fruto en la que la concentración es bastante similar o incluso superior para el primer estado de maduración.

En el primer estado de maduración, el incremento en la concentración total de capsaicinoides se produce hasta el día 30 (M-3) de maduración, a partir del cual la concentración disminuye hasta el día 60 (M-6). Con respecto al segundo periodo de maduración, la concentración total de capsaicinoides aumentó paulatinamente hasta el día 60 (M-6) de maduración, no observándose una disminución en la concentración hasta el día 70 (M-7). Se observa por tanto, que el segundo periodo de maduración, además de presentar concentraciones de capsaicinoides, por lo general superiores, mantiene el incremento en la concentración total de capsaicinoides más tiempo que el primer periodo de maduración.

IV. 4. 1. 3. 2. Pimiento Extra Picante (placenta).

Planta joven.

El pimiento Extra Picante empezó a producir pimientos a fecha del 7 de enero de 2006. Las muestras estudiadas para la placenta coinciden con las descritas para el pericarpio (tabla 82).

Con respecto a la placenta en su primer estado de maduración (figura 67), se observa que al igual que ocurre con el pimiento, se produce un incremento en la concentración de capsaicinoides hasta el día 30 (M-3). Se observa que en el día 40 (M-4) de maduración, hay una caída muy pronunciada en la concentración de capsaicinoides en la placenta. Esta caída tan pronunciada se producía a los 50 días (M-5) en el pimiento. Este desfase es lógico, ya que es en la placenta donde se producen los capsaicinoides, y en el pericarpio donde se almacenan. A partir de esta fecha, se observa por lo general, un incremento en la concentración de capsaicinoides en la placenta, probablemente debido al descenso en la actividad de las peroxididasas y por otra parte a la pérdida de agua que se observa en el pimiento cuando se produce la sobremaduración del fruto. Esta pérdida de agua que se produce en el fruto en este periodo de sobremaduración, hace que los compuestos presentes en el pimiento se vean más concentrados.

Planta adulta.

En la figura 67 se observa una evolución algo distinta en la placenta, cuando la planta es adulta, a la que se observa en el pimiento. En la placenta se produce un incremento paulatino en la concentración de capsaicinoides hasta el día 40 (M-4). En el día 50 (M-5) se produce una caída moderada en la concentración de capsaicinoides, pero no tan brusca como se producía para la placenta de esta variedad en el primer periodo de maduración. Hasta el día 70 (M-7) se observa de nuevo un incremento en la concentración de capsaicinoides, fecha a partir de la cual por lo general hay una disminución en la concentración.

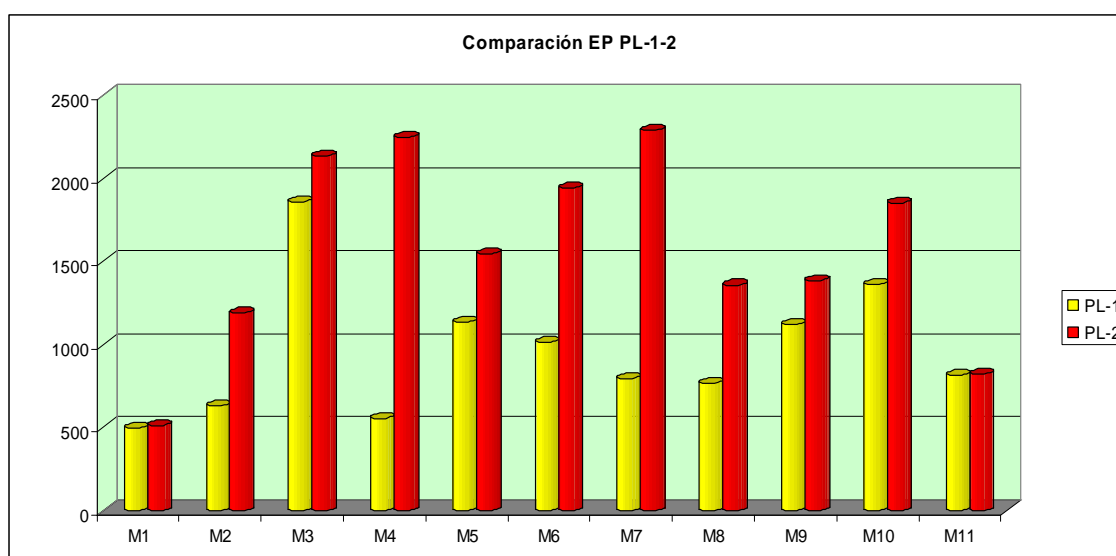


Figura 67: Comparación de los capsaicinoides totales ($\mu\text{mol/Kg}$) en la placenta del pimiento Extra Picante entre los dos periodos de maduración del fruto.

Comparación de la cantidad total de capsaicinoides en los dos estados de maduración (placenta).

Con respecto a la placenta (figura 67), se observa que la concentración total de capsaicinoides es superior en todo el muestreo en el segundo periodo de maduración, al igual que ocurriría con el pericarpio del pimiento salvo en los primeros días de la maduración. Este incremento en la concentración de capsaicinoides que se observa en el pimiento Extra Picante, tanto en el pimiento, y sobre todo en la placenta, puede ser debido a varias circunstancias. Por un lado se puede suponer que la planta madura tiene una mayor capacidad de sintetizar los capsaicinoides. Por otro lado se puede achacar este incremento en la concentración de capsaicinoides en el segundo periodo de maduración a los factores climáticos a los que ha estado expuesta la planta en este periodo. Durante este segundo periodo de maduración, el invernadero ha estado a una temperatura superior que en el primer estado de maduración, por coincidir con los meses de primavera e inicio del verano. Estos factores climáticos pueden haber influido en la síntesis de estos compuestos por la planta y por tanto en la cantidad de capsaicinoides totales que presenta el fruto.²⁹⁹

Comparación del contenido en capsaicinoides totales entre el pimiento y la placenta.

Se ha realizado la relación del contenido en capsaicinoides totales entre el pimiento y la placenta en los dos estados de vejez de la planta estudiados. Como se comentó anteriormente los capsaicinoides se sintetizan en la placenta y de ésta pasan posteriormente al fruto o a otras partes de la planta, por lo que la mayor cantidad de capsaicinoides debe de estar presente en la placenta.

Planta joven.

Las cantidades de capsaicinoides totales para la planta en su primer estado de vejez, expresadas en ($\mu\text{mol/kg}$) tanto para el pimiento como la placenta, así como su relación vienen expuestas en la tabla 84.

²⁹⁹ B. Estrada, J. Díaz, F. Merino, M.A. Bernal. "The effect of seasonal changes on the pungency level of Padrón pepper fruits". Capsicum Eggplant Newsletters, 18: 28-31, 1999.

Muestra	Pi ($\mu\text{mol/kg}$)	PL ($\mu\text{mol/kg}$)	PL/Pi
M1	227,01	495,23	2,18
M2	458,00	628,0	1,37
M3	678,08	1855,56	2,73
M4	519,30	553,93	1,06
M5	135,46	1132,81	8,36
M6	242,69	1012,52	4,18
M7	373,93	795,58	2,12
M8	211,22	767,09	3,63
M9	174,86	1116,76	6,38
M10	207,95	1357,18	6,52
M11	127,64	813,29	6,37

Tabla 84: Capsaicinoides totales (placenta-pimiento) en el pimiento Extra Picante en su primer estado de maduración y su relación.

A la vista de la tabla se observa que la concentración de capsaicinoides en la placenta es superior que en el pimiento en todo momento. La relación de concentraciones varía dependiendo del momento de maduración del fruto, rondando estos valores desde el 1,06 al 8,36. De todas maneras, se observa, para el primer estado de desarrollo de la planta, que cuando el fruto está más maduro es cuando se obtienen las mayores diferencias de concentración de capsaicinoides entre el pericarpio y la placenta del pimiento.

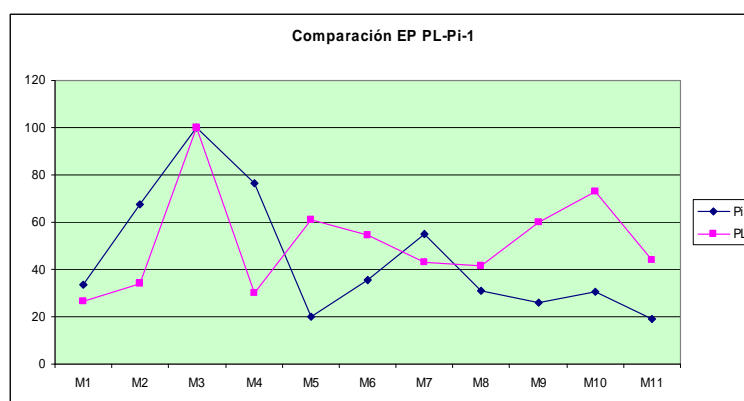


Figura 68: Evolución del porcentaje en capsaicinoides totales ($\mu\text{mol/Kg}$) en el pimiento y en la placenta del pimiento Extra Picante en su primer estado de maduración.

Con respecto a la evolución del porcentaje en capsaicinoides totales en el primer estado de maduración (figura 68), se observa que existe un pequeño desfase en el mínimo de concentración entre el pimiento y la placenta. Este mínimo se encuentra en el día 40 (M-4) en la placenta, mientras que en el pimiento en el día 50 (M-5). Este resultado es

lógico ya que estos compuestos se generan en la placenta pasando posteriormente de esta al pimiento.

Planta adulta.

Se ha calculado la relación del contenido en capsaicinoides totales entre el pimiento y la placenta en el segundo periodo de maduración, igual que se hizo anteriormente con el primero. Las cantidades de capsaicinoides totales expresadas en ($\mu\text{mol/kg}$) tanto para el pimiento como para la placenta, así como su relación vienen expuestas en la tabla 85.

Muestra	Pi ($\mu\text{mol/kg}$)	PL ($\mu\text{mol/kg}$)	PL/Pi
M1	242,37	512,29	2,11
M2	442,54	1186,95	2,68
M3	559,56	2133,44	3,81
M4	770,88	2243,04	2,90
M5	786,47	1541,22	1,95
M6	894,09	1937,75	2,16
M7	484,94	2285,20	4,71
M8	830,33	1356,06	1,63
M9	397,01	1383,15	3,48
M10	845,71	1848,61	2,18
M11	258,53	820,40	3,17

Tabla 85: *Capsaicinoides totales (placenta-pimiento) en el pimiento Extra Picante en su segundo estado de maduración y su relación.*

Como era de esperar, el contenido en capsaicinoides totales de la placenta es superior al del pimiento, estando esta relación comprendida entre 1,63 y 4,71 para el segundo estado de maduración del pimiento Extra Picante. Para la placenta no se observan diferencias apreciables en las relaciones de estos valores entre pimientos poco maduros y pimientos maduros.

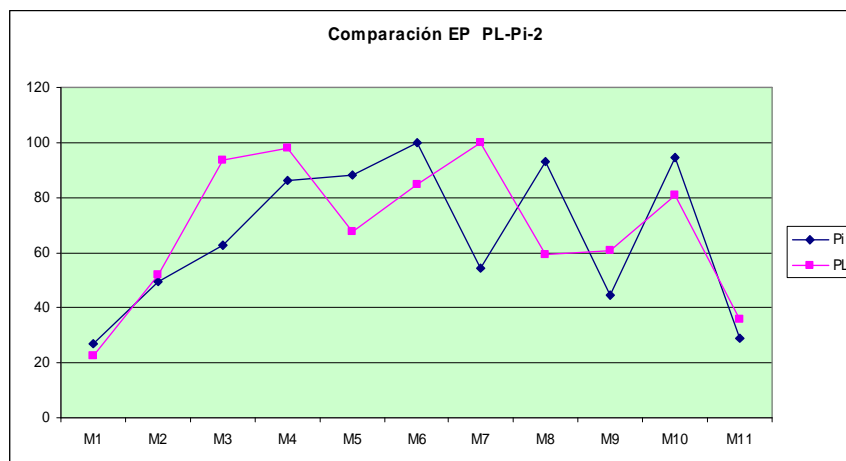


Figura 69: Evolución del porcentaje en capsaicinoides totales ($\mu\text{mol/Kg}$) en el pimiento y en la placenta del pimiento Extra Picante en su segundo estado de maduración.

Se observa (figura 69) que también existe un desfase en la evolución del porcentaje de capsaicinoides totales entre el pimiento y la placenta de esta variedad en su segundo estado de maduración. De nuevo se aprecia un retardo en el máximo de concentración y en el mínimo en el pimiento con respecto a la placenta, siendo en este caso de 20 días.

IV. 4. 1. 4. Pimiento Bolilla (*Capsicum annuum*).

Se ha seguido, igual que con el pimiento Extra Picante, la evolución de los capsaicinoides en el pimiento Bolilla, tanto en el pimiento (pericarpio) como en la placenta. De la misma forma, esta evolución se ha estudiado tanto en el periodo joven de la planta como en el periodo adulto de la misma.

Las plantas del pimiento Bolilla han presentado también un crecimiento bastante pronunciado. A pesar de este crecimiento, no han llegado a alcanzar la altura tan elevada de las plantas del pimiento Extra Picante, llegando a medir alturas en torno a 150 centímetros. La densidad foliar de esta variedad de pimiento ha sido bastante superior que la del pimiento Extra Picante, pero algo inferior que la del pimiento Cayena. Los pimientos Bolilla, presentan una forma redondeada, parecida a la de los tomates, presentando un diámetro en torno a los 2-3,5 centímetros. Esta variedad se ha visto muy afectada por la plaga de la mosca blanca necesitando continuamente de la fumigación de las plantas. Esto ha hecho que el desarrollo normal de las plantas y de los frutos se viera afectado. La productividad de esta variedad de pimiento ha sido bastante pequeña, muy inferior a la que se ha obtenido con las plantas de la variedad Extra Picante.

Los resultados obtenidos en estos dos estados de la planta tanto para el pericarpio del pimiento como para la placenta vienen recogidos a continuación:

IV. 4. 1. 4. 1. Pimiento Bolilla (pericarpio).

Como ya se ha comentado, en este trabajo se ha estudiado la evolución del contenido en capsaicinoides en el pericarpio del pimiento, tanto cuando la planta es joven como cuando la planta es más adulta. A continuación se comentan los resultados obtenidos con el pericarpio del pimiento Bolilla.

Planta joven.

El pimiento Bolilla empezó a producir pimientos a fecha del 7 de enero de 2006 al igual que lo hizo el pimiento Extra Picante. El muestreo de maduración realizado con esta variedad ha sido el mismo que para el pimiento Extra Picante (tabla 86), observándose características de color prácticamente similares en ambas variedades de pimientos.

Nomenclatura	Fecha de la selección del fruto	Días de maduración del fruto en la recolección	Estado visual del fruto en la fecha de recolección
M-11	7/01/2006	110	Sobremaduración
M-10	17/01/2006	100	Sobremaduración
M-9	27/01/2006	90	Sobremaduración
M-8	6/02/2006	80	Color rojo
M-7	16/02/2006	70	Color rojo
M-6	27/02/2006	59	Color rojo
M-5	8/03/2006	50	Color rojo
M-4	17/03/2006	41	Color verde-rojo
M-3	28/03/2006	30	Color verde
M-2	7/04/2006	20	Color verde
M-1	17/04/2006	10	Color verde

Tabla 86: *Propiedades de los pimientos Bolilla recolectados en la primera etapa de vejez de la planta.*

Con respecto al pericarpio del pimiento en el primer estado de maduración, se observa en la figura 70, en la que se representa una comparación en la concentración total de capsaicinoides en el pericarpio del pimiento en los dos estados de vejez de la planta estudiados, que se produce un incremento muy brusco en la cantidad de capsaicinoides totales hasta el día 30 (M-3) de maduración. Ya en el día 40 (M-4) se observa una bajada también bastante brusca en la concentración de capsaicinoides en el pimiento. Esta bajada, que también se observaba en el pimiento Extra Picante, puede ser debida como ya se comentó anteriormente a la acción de las peroxidasas. A partir de esta fecha de maduración la concentración total de capsaicinoides se mantiene más o menos constante sin demasiadas fluctuaciones.

Planta adulta.

Igual que con el pimiento Extra Picante, se ha realizado el estudio de la evolución de los capsaicinoides, siendo la planta adulta, en el pericarpio del pimiento bolilla. De igual forma el seguimiento de maduración en este periodo ha sido el mismo que para el pimiento Extra Picante. Las características de maduración de estas dos variedades de pimientos también han sido similares (tabla 87).

Nomenclatura	Fecha de la selección del fruto	Días de maduración del fruto en la recolección	Estado visual del fruto en la fecha de recolección
M-11	17/03/2006	111	Sobremaduración
M-10	28/03/2006	100	Sobremaduración
M-9	7/04/2006	90	Sobremaduración
M-8	17/04/2006	80	Color rojo
M-7	27/04/2006	70	Color rojo
M-6	8/05/2006	59	Color rojo
M-5	17/05/2006	50	Color rojo
M-4	26/05/2006	41	Color verde-rojo
M-3	6/06/2006	30	Color verde
M-2	16/06/2006	20	Color verde
M-1	26/06/2006	10	Color verde

Tabla 87: *Propiedades de los pimientos Bolilla recolectados en la segunda etapa de vejez de la planta.*

La evolución en el contenido en capsaicinoides para el pericarpio del pimiento, cuando la planta es madura, viene recogida en la figura 70, en la que se representa además la evolución en el contenido total de capsaicinoides en el primer estado de vejez de la planta. Todos los ensayos han sido llevados a cabo por duplicado.

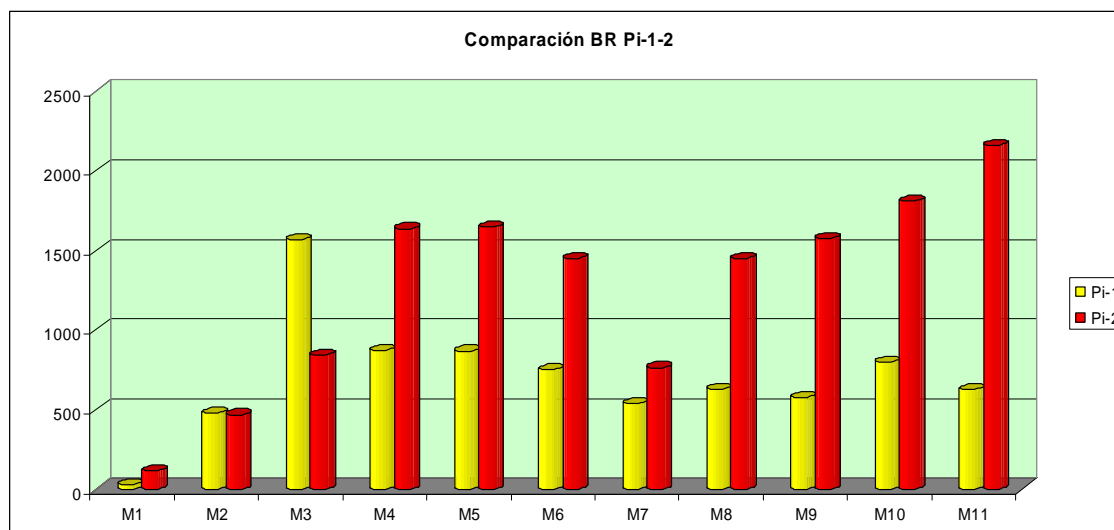


Figura 70: Comparación de los capsaicinoides totales ($\mu\text{mol/Kg}$) en el pimiento Bolilla entre los dos periodos de maduración del fruto.

Con respecto a la cantidad de capsaicinoides totales presentes en el pericarpio del pimiento Bolilla en el segundo estado de maduración, se observa (figura 70) que se produce un aumento en la concentración de capsaicinoides hasta el día 50 (M-5) de maduración. A partir del día 60 (M-6) se observa una disminución en la concentración de capsaicinoides, llegando al día 70 (M-7) a un mínimo bastante pronunciado en la concentración. A partir del día 80 (M-8) se observa un incremento suave en la concentración de capsaicinoides. Este hecho no se observó en el primer muestreo. Se podría achacar este efecto a la mayor temperatura del invernadero y por tanto a un proceso de deshidratación más marcado.

Comparación de la cantidad total de capsaicinoides en los dos estados de maduración (pericarpio).

Finalmente se ha realizado, como se hizo con el pimiento Extra Picante, la comparación en el contenido total de capsaicinoides para los dos estados de maduración en el pericarpio del pimiento. Esta comparación permitirá conocer si hay diferencias en el contenido en capsaicinoides según el estado de vejez de la planta.

Con respecto al pimiento, se observa (figura 70) que por lo general, la concentración de capsaicinoides totales es superior en el segundo periodo de maduración que en el primero, salvo entre los días 20 (M-2) y 30 (M-3) de maduración del fruto (principalmente en el día 30 de maduración), en la que la concentración es bastante similar o incluso superior (día 30) para el primer estado de maduración, al igual que ocurriría con el pimiento Extra Picante.

También se observa para esta variedad de pimiento, que en el primer estado de maduración, el incremento en la concentración total de capsaicinoides se produce hasta el día 30 (M-3) de maduración, a partir del cual, la concentración disminuye hasta el día 60 (M-6). Con respecto al segundo periodo de maduración, la concentración total de

capsaicinoides aumentó paulatinamente hasta el día 50 (M-5) de maduración, no observándose una disminución considerable en la concentración total de capsaicinoides hasta el día 70 (M-7) de maduración. Se observa por tanto, que el segundo periodo de maduración, además de presentar por lo general concentraciones de capsaicinoides superiores al primer periodo, mantiene el incremento en la concentración total de capsaicinoides durante más tiempo que el primer periodo de maduración. Este mismo efecto se observa en el pimiento extra picante como se ha comentado con anterioridad.

IV. 4. 1. 4. 2. Pimiento Bolilla (placenta).

Se ha estudiado además la evolución en el contenido en capsaicinoides en la placenta del pimiento Bolilla, tanto cuando la planta es joven como cuando la planta es adulta. A continuación se comentan los resultados obtenidos con la placenta del pimiento.

Planta joven.

El pimiento Bolilla empezó a producir pimientos a fecha del 7 de enero de 2006. El seguimiento de maduración de esta variedad en este periodo viene recogido en la tabla 84, tal como se comentó anteriormente para el pericarpio del pimiento.

Si se observa la figura 71 en la que se representa la concentración total de capsaicinoides en la placenta tanto en el primer estado de maduración como en el segundo, se comprueba que la concentración de capsaicinoides se incrementa en este caso hasta el día 40 (M-4). A partir de esta fecha se produce una disminución suave en la concentración de capsaicinoides hasta el día 80 (M-8) de maduración. En el día 90 (M-9) la disminución que se produce en la concentración es bastante brusca, aumentando de nuevo en el día 100 (M-10). Se observa por tanto un aumento en la concentración en estos compuestos hasta el día 40 (M-4) de maduración, observándose que a partir de esta fecha la concentración disminuye por lo general.

Planta adulta.

Respecto a la evolución en el contenido total de capsaicinoides en la placenta del pimiento Bolilla, en el segundo periodo de maduración (figura 71), se observa un incremento en la concentración de capsaicinoides hasta el día 50 (M-5) de maduración. En el día 60 (M-6) se observa una disminución brusca de la concentración, manteniéndose a partir de aquí relativamente constante con algunas fluctuaciones. Con respecto al pericarpio del pimiento en este mismo periodo de maduración, se observa en la placenta una disminución mucho más pronunciada en la concentración de capsaicinoides en el día 60 (M-6) de maduración que en el pimiento.

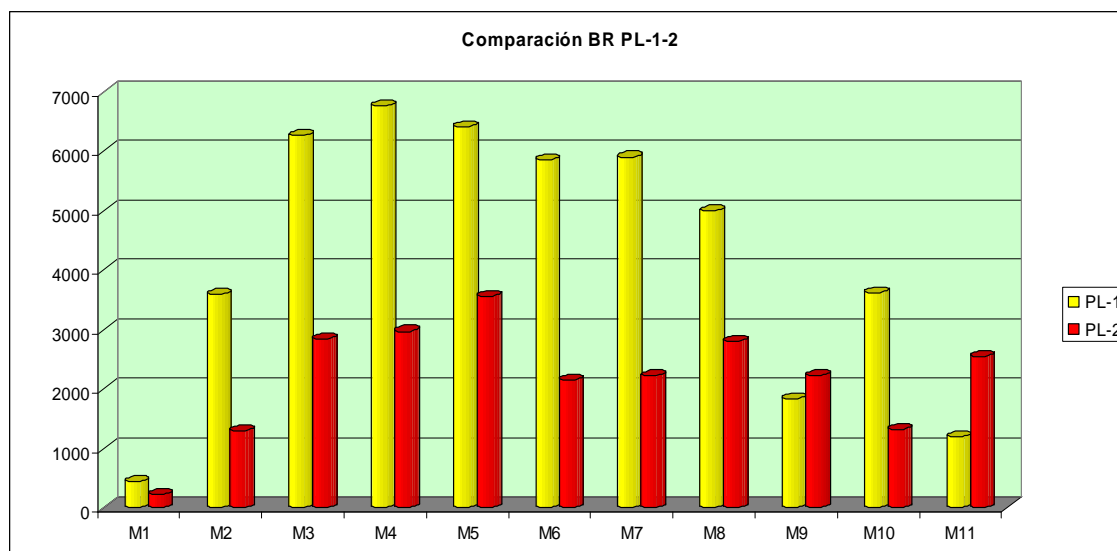


Figura 71: Comparación de los capsaicinoides totales ($\mu\text{mol/Kg}$) en la placenta del pimiento Bolilla entre los dos periodos de maduración del fruto.

Comparación de la cantidad total de capsaicinoides en los dos estados de maduración (placenta).

Con respecto a la placenta (figura 71), se observa algo totalmente diferente a lo observado con anterioridad. En este caso, la mayor concentración de capsaicinoides totales corresponde al primer periodo de desarrollo de la planta, y no al segundo, como ocurría en el pericarpio del pimiento de esta variedad o en el pimiento Extra Picante, tanto para el pimiento (pericarpio) como para la placenta.

Esto hace pensar que además de factores climáticos y de vejez de la planta, hay determinados factores genéticos y también de defensa frente agresiones ambientales o de plagas (mosca blanca), que afectan a la producción de los capsaicinoides en el fruto.
300,301,302

Para confirmar este aspecto sería necesario realizar un seguimiento en plantas sanas y evitar de esa forma la influencia de las plagas. Si se confirmara el efecto, sería de una alta importancia económica, al producirse una importante disminución en la producción de capsaicinoides.

³⁰⁰ P. Kirschbaum-Titze, C. Hiepler, E. Mueller-Seitz, M. Petz. "Pungency in Paprika (*Capsicum annum*). 1. Decrease of capsaicinoid content following cellular disruption". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 1264-1266, 2002.

³⁰¹ K.P. Harvell, P.W. Bosland. "The environmental produces a significant effect on pungency of chiles". HortScience, 32: 1292-1292, 1997.

³⁰² B. Estrada, F. Pomar, J. Díaz, F. Merino, M.A. Bernal. "Pungency level in fruits of the Padron pepper with different water supply". Scientia Horticulturae, 81: 385-396, 1999.

Comparación del contenido en capsaicinoides totales entre el pimiento y la placenta.

Se ha realizado la relación del contenido en capsaicinoides totales entre el pimiento y la placenta del pimiento Bolilla en los dos estados de vejez de la planta estudiados al igual que se hizo con el pimiento Extra Picante. Como ya se ha comentado, los capsaicinoides son sintetizados y almacenados en la placenta por lo que debemos de obtener una mayor cantidad de estos compuestos en la placenta que en el pimiento.

Planta joven.

Las cantidades de capsaicinoides totales para la planta en su primer estado de vejez, expresadas en ($\mu\text{mol/kg}$) tanto para el pimiento como para la placenta, así como su relación vienen expuestas en la tabla 88.

Muestra	Pi ($\mu\text{mol/kg}$)	PL ($\mu\text{mol/kg}$)	PL/Pi
M1	25,27	429,54	16,99
M2	475,69	3582,38	7,53
M3	1565,98	6260,02	3,99
M4	869,21	6758,66	7,77
M5	865,64	6411,37	7,40
M6	750,82	5846,95	7,78
M7	534,89	5897,99	11,02
M8	626,68	4989,12	7,96
M9	574,38	1827,48	3,18
M10	795,51	3612,01	4,54
M11	622,48	1185,08	1,90

Tabla 88: Capsaicinoides totales (placenta-pimiento) en el pimiento Bolilla en su primer estado de maduración y su relación.

A la vista de la tabla 88 se observa que la concentración de capsaicinoides totales en la placenta es superior que en el pimiento, como era de esperar. La relación de concentraciones varía dependiendo del momento de maduración del fruto, rondando estos valores desde el 1,90 al 16,99. No se observa una tendencia clara en los valores de de esta relación, aunque en este caso en particular, parecen que las relaciones menores suelen coincidir con los frutos más maduros.

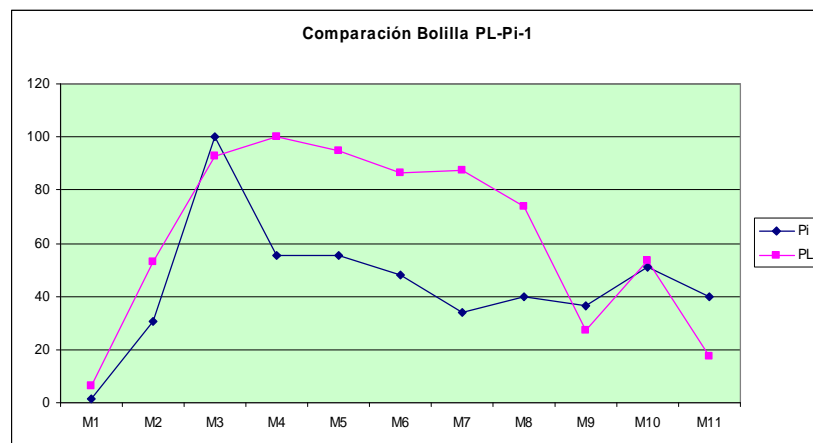


Figura 72: Evolución del porcentaje en capsaicinoides totales ($\mu\text{mol/Kg}$) en el pimiento y en la placenta del pimiento Bolilla en su primer estado de maduración.

No se encuentra en este caso el desfase observado en casos anteriores. Tan solo se observan porcentajes de concentración en el pimiento notablemente inferiores que en la placenta.

Planta adulta.

Se ha estudiado la relación del contenido en capsaicinoides totales entre el pimiento (pericarpio) y la placenta en el segundo periodo de maduración del pimiento Bolilla. Las cantidades de capsaicinoides totales expresadas en ($\mu\text{mol/kg}$) tanto para el pimiento como para la placenta, así como su relación vienen expuestas en la tabla 89.

Se observa (tabla 89) que hay una mayor cantidad de capsaicinoides en la placenta que en el pimiento, como era de esperar, salvo en el muestreo M-9. La relación de capsaicinoides totales entre la placenta y el pimiento esta por lo general comprendida entre valores de 1 y de 3, en este caso particular. Estos valores son muy inferiores a las relaciones obtenidas en el primer periodo de maduración.

Muestra	Pi ($\mu\text{mol/kg}$)	PL ($\mu\text{mol/kg}$)	PL/Pi
M1	112,74	211,55	1,87
M2	465,48	1294,74	2,78
M3	841,06	2842,01	3,37
M4	1635,63	2964,24	1,81
M5	1645,06	3550,25	2,15
M6	1448,76	2147,11	1,48
M7	762,10	2216,92	2,90
M8	1447,88	2803,18	1,93
M9	1572,83	2219,71	1,41
M10	1806,87	1316,24	0,72
M11	2158,82	2539,07	1,17

Tabla 89: Capsaicinoides totales (placenta-pimiento) en el pimiento Bolilla en su segundo estado de maduración y su relación.

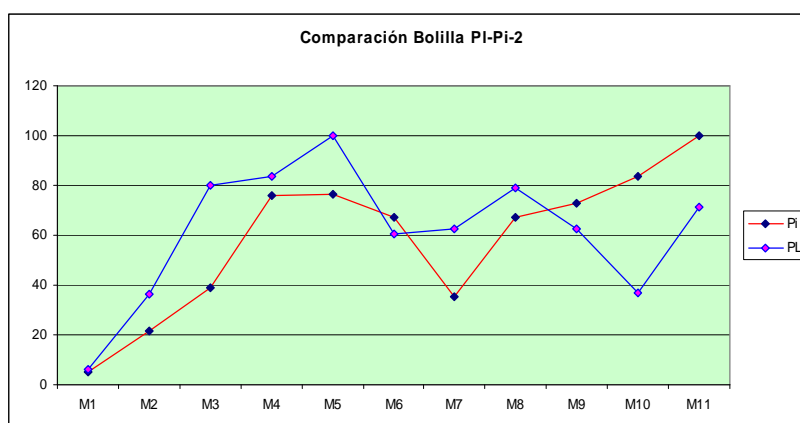


Figura 73: Evolución del porcentaje en capsaicinoides totales ($\mu\text{mol/Kg}$) en el pimiento y en la placenta del pimiento Bolilla en su segundo estado de maduración.

En este caso sí se observa el desfase entre la concentración en el centro de producción (placenta) y el propio fruto.

IV. 4. 1. 5. Comparación de la cantidad de capsaicinoides totales entre el pimiento Extra Picante y el pimiento Bolilla.

Se ha comparado la cantidad de capsaicinoides totales presentes tanto en el pimiento Extra Picante como en el pimiento Bolilla. Además se ha comparado la evolución relativa de la cantidad total de capsaicinoides en estas dos variedades de pimientos. Esta comparación se ha realizado tanto para el pimiento como para la placenta de las dos variedades de pimientos en ambos periodos de maduración.

Comparación en el pimiento.

Si comparamos los datos de concentración de capsaicinoides totales en el pericarpio del pimiento de estas dos variedades de pimientos en su primer estado de maduración (tablas 84 y 88) se observa que el pimiento Bolilla posee una mayor cantidad de capsaicinoides totales que el pimiento Extra Picante, salvo en los primeros 10 días de maduración del fruto. Esta misma tendencia se observa en el segundo periodo de maduración (tablas 85 y 89), por lo que resulta que el pimiento Bolilla, en estas condiciones de cultivo es una variedad más picante que el pimiento Extra Picante.

Además se ha realizado una comparativa de la evolución relativa del contenido total de capsaicinoides para comprobar si la evolución en la producción de capsaicinoides sigue la misma tendencia en estas dos variedades de pimientos. Esta comparación en la evolución relativa se ha realizado al pericarpio del pimiento tanto en el primer estado de maduración (figura 74), como en el segundo (figura 75).

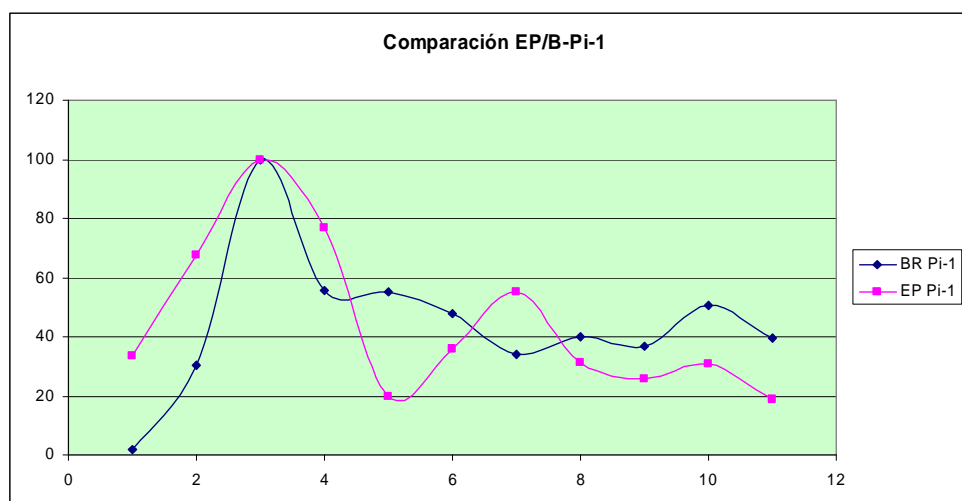


Figura 74: Evolución relativa de la cantidad de capsaicinoides totales en el pericarpio del pimiento Bolilla y Extra Picante en su primer estado de maduración.

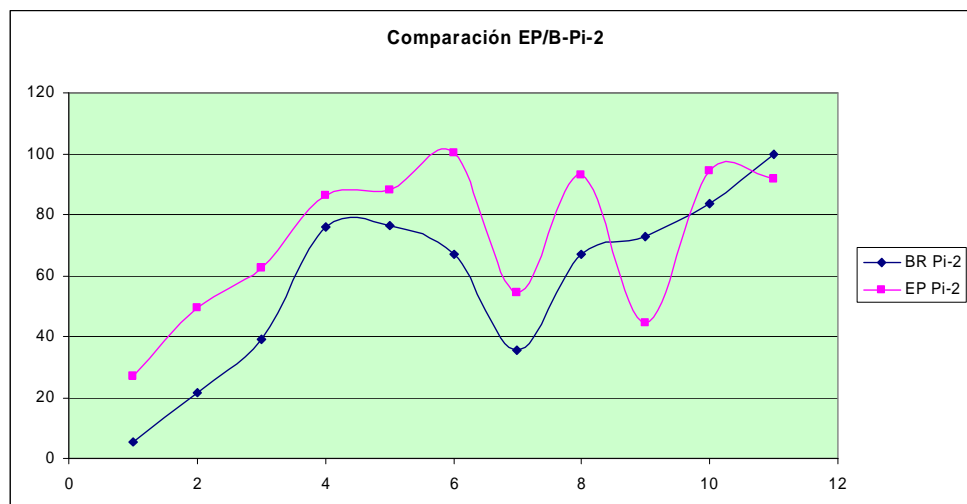


Figura 75: Evolución relativa de la cantidad de capsaicinoides totales en el pericarpio del pimiento Bolilla y Extra Picante en su segundo estado de maduración.

Se observa, en el primer estado de maduración (figura 74), que la evolución relativa de capsaicinoides para estas dos variedades de pimientos es bastante similar, sobre todo en los primeros 40 días de maduración del fruto, en los que se aprecia un incremento relativo en la concentración de capsaicinoides hasta el día 30 de maduración del fruto, fecha a partir de la cual hay una disminución brusca en la cantidad relativa de capsaicinoides (sobre todo en el pimiento Extra picante), para posteriormente presentar una concentración más o menos estable de capsaicinoides.

Para el segundo estado de maduración (figura 75) se observa que la evolución para ambas variedades también es bastante similar, pero distinta a la evolución que presentaban éstas en el primer estado de maduración. En este caso se observa que hay un incremento mantenido en la concentración relativa de capsaicinoides hasta el día 60 en el pimiento Extra Picante y hasta el día 50 en el pimiento Bolilla, fecha a partir de la cual se observa un descenso brusco en la cantidad de capsaicinoides hasta el día 70 en las dos variedades de pimientos. A partir de esta fecha la tendencia no está definida para el pimiento Extra Picante, mientras que se observa un aumento para el pimiento Bolilla.

Se comprueba por tanto que la evolución es distinta dependiendo del periodo de maduración, presentándose el máximo de la concentración relativa de capsaicinoides a los 30 días en el primer periodo de maduración y a los 50-60 días en el segundo, siendo esta evolución dependiente del grado de vejez de la planta, más que de la propia variedad.

Comparación en la placenta.

También se ha comparado la cantidad total de capsaicinoides presentes en la placenta de estas dos variedades de pimientos en sus dos estados de envejecimiento de la planta. Se observa para el primer estado de maduración (tablas 84 y 88) que la placenta del pimiento Bolilla produce mucha mayor cantidad de capsaicinoides que la del pimiento Extra Picante. Para el segundo estado de maduración (tablas 85 y 89), la cantidad de capsaicinoides totales en la placenta del pimiento Bolilla es en general superior que la que

existe en el pimiento Extra Picante, aunque esta diferencia de concentración no es tan acusada como ocurría con el primer estado de maduración.

Además se ha realizado una comparativa de la evolución relativa del contenido total de capsaicinoides en la placenta para comprobar si la evolución en la producción de capsaicinoides sigue la misma tendencia en estas dos variedades de pimientos, al igual que se hizo con el pericarpio. Esta comparación en la evolución relativa se ha realizado a la placenta del pimiento tanto en el primer estado de maduración (figura 76), como en el segundo (figura 77).

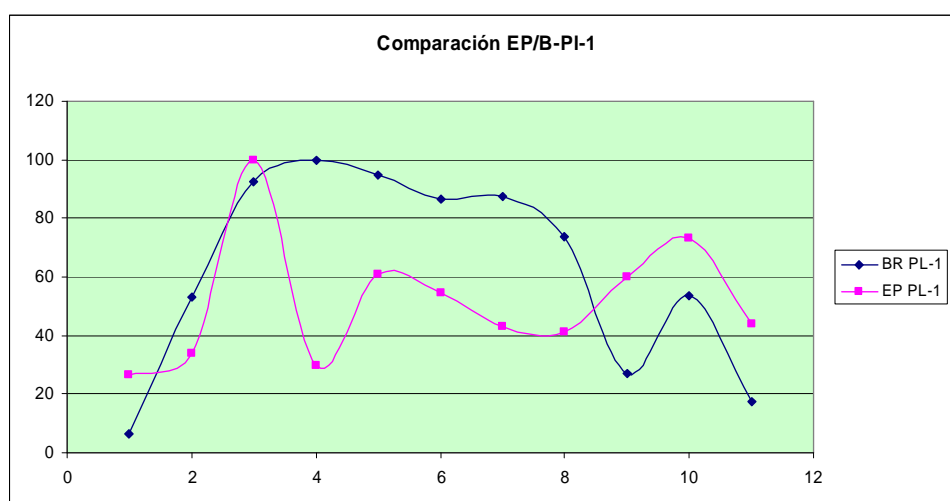


Figura 76: Evolución relativa de la cantidad de capsaicinoides totales en la placenta del pimiento Bolilla y Extra Picante en su primer estado de maduración.

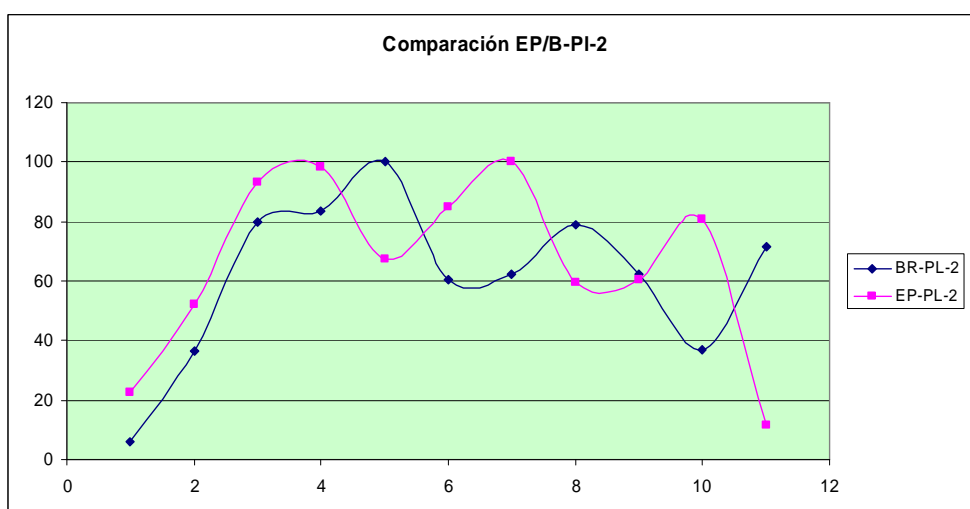


Figura 77: Evolución relativa de la cantidad de capsaicinoides totales en la placenta del pimiento Bolilla y Extra Picante en su segundo estado de maduración.

Se observa, en el primer estado de maduración para la placenta (figura 76), que la evolución relativa de capsaicinoides para estas dos variedades de pimientos no es muy similar.

Para el segundo estado de maduración (figura 77) se observa que la evolución para ambas variedades es bastante más parecida. En el caso del segundo estado de vejez, las evoluciones si son más parecidas, aunque hay desfases en los máximos y mínimos relativos, pero éstos similares en número e intensidad.

Se observa por tanto que las dos variedades de pimientos en general presentan tendencias bastante similares en la evolución en el contenido en capsaicinoides tanto para la placenta como para el pericarpio. En un inicio hay un incremento en la cantidad total de capsaicinoides hasta una fecha determinada, a partir de la cual hay descenso más o menos brusco en la concentración de capsaicinoides dependiendo del caso que se trate. Parece comprobarse que el máximo en la cantidad total de capsaicinoides se retrasa en el tiempo conforme la planta de pimiento va envejeciendo.

IV. 4. 1. 6. Pimiento Cayena (*Capsicum frutescens*).

El pimiento Cayena (*Capsicum frutescens*) es de una especie de pimientos distinta a la del pimiento Extra Picante y pimiento Bolilla (*Capsicum annuum*). Esta variedad se ha comportado de una manera bastante diferente a la que han presentado las otras dos variedades de pimientos cultivadas. Las plantas del pimiento Cayena fueron las primeras en echar flores, pero estas flores, transcurridos unos días se secaron, coincidiendo con los periodos de más frío en el invernadero. Esta variedad no volvió a florecer hasta mediados de febrero, periodo en el que ya no hace tanto frío como en pleno invierno. De tal forma que dicha planta no empezó a producir pimientos hasta el 16 de febrero de 2006 (las otras dos variedades florecieron a principios de enero). A partir de esta fecha se ha seguido el proceso de maduración.

Cabe también destacar, que esta variedad de pimientos ha dejado de producir pimientos antes que el pimiento Extra Picante y que el pimiento Bolilla, dejando de producir frutos a finales de mayo. Esto ha hecho, que con esta variedad no se haya podido realizar la comparación de la evolución del contenido en capsaicinoides en los dos periodos de la planta, sino tan solo en un periodo temporal intermedio entre los dos estudiados con el pimiento Bolilla y el pimiento Extra Picante.

Las plantas del pimiento Cayena han presentado características morfológicas bastante diferentes que las que han presentado las otras dos variedades de pimientos. Estas plantas no han crecido tanto como las otras dos variedades, presentando una altura media de unos 50 centímetros. La densidad foliar de la planta del pimiento Cayena ha sido muy elevada, siendo en muchas ocasiones casi imposible llegar a ciertas partes de la planta para realizar los muestreos. Los pimientos Cayena presentan una forma alargada y picuda, parecida a la del pimiento Extra Picante, pero con la salvedad de que estos pimientos son mucho más pequeños (en torno a 2-3 centímetros) y delgados (no llegando al centímetro de grosor).

Otra característica morfológica a resaltar de esta variedad de pimiento, es que nacen mirando hacia arriba, al contrario de lo que ocurre con las otras dos variedades en las cuales los pimientos crecen hacia el suelo. El pimiento Cayena también se ha visto muy afectado por la plaga de la mosca blanca, aunque no tanto como el pimiento Bolilla. La productividad de esta variedad de pimiento ha sido muy elevada, produciendo las plantas un gran número de pimientos. En algunas partes casi se apreciaban más pimientos que hojas. De todas formas la producción en peso total de estos pimientos no ha sido muy elevada, debido al pequeño tamaño de los mismos.

Como se ha comentado anteriormente, esta variedad de pimiento apenas presenta placenta, presentando únicamente unos hilillos adheridos a las paredes del pimiento. Por tal motivo no se ha podido realizar en el estudio la distinción en el contenido en capsaicinoides entre el pimiento y la placenta.

Se tiene por tanto que esta variedad se ve enormemente afectada por las temperaturas extremas, ya que deja de producir pimientos tanto a temperaturas relativamente bajas como altas.

Las fechas en las que se ha controlado la maduración de los pimientos, así como el estado de los pimientos en la fecha de su recolección, vienen expuestas a continuación en la tabla 90.

Nomenclatura	Fecha de la selección del fruto	Días de maduración del fruto en la recolección	Estado visual del fruto en la fecha de recolección
M-11	16/02/2006	110	Sobremaduración
M-10	27/02/2006	99	Sobremaduración
M-9	8/03/2006	90	Sobremaduración
M-8	17/03/2006	80	Color rojo
M-7	28/03/2006	70	Color rojo
M-6	7/04/2006	59	Color rojo
M-5	17/04/2006	50	Color rojo
M-4	27/04/2006	41	Color verde-rojo
M-3	8/05/2006	30	Color verde
M-2	17/05/2006	20	Color verde
M-1	26/05/2006	11	Color verde

Tabla 90: *Propiedades de los pimientos cayena recolectados en este estudio.*

La recolección de esta variedad de pimiento se ha realizado a fecha de 6/06/2006. Los primeros pimientos recolectados han presentado por tanto una maduración de 11 días. Los datos obtenidos de concentración total de capsaicinoides expresados en $\mu\text{mol/kg}$ de pimiento fresco para esta variedad vienen recogidos en la figura 78.

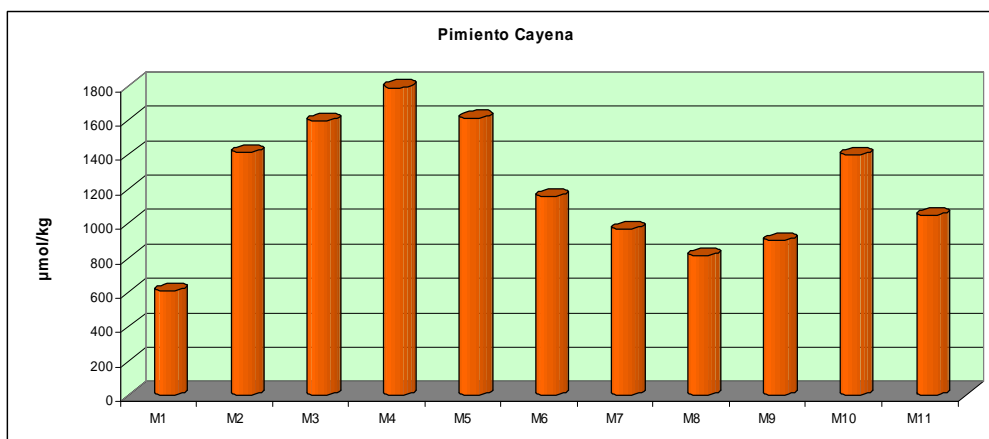


Figura 78: *Cantidad de capsaicinoides totales ($\mu\text{mol/kg}$) del pimiento Cayena en diferentes estados de maduración.*

Se observa que se produce un incremento en la cantidad de capsaicinoides totales hasta el día 40 (M-4) de maduración. A partir del día 50 (M-5) se produce una disminución moderada de los capsaicinoides hasta el día 80 (M-8), día a partir del cual se observa un incremento en la concentración, seguramente por la concentración de los capsaicinoides que se produce debido a las pérdidas de agua en el pimiento en los estados de sobremaduración.

En general, esta variedad de pimiento presenta un comportamiento parecido al que presentan el pimiento Extra Picante y el pimiento Bolilla. Al inicio de la maduración del pimiento se observa un incremento en la cantidad de capsaicinoides totales, llegando hasta un máximo, a partir del cual la concentración en capsaicinoides empieza a disminuir. En este caso la disminución ha sido paulatina, no observándose una bajada excesivamente brusca. Finalmente se observa en los pimientos más maduros (sobremaduración) una tendencia ascendente, no demasiado clara, de la concentración total de capsaicinoides, tal como se ha venido observando con las otras dos variedades de pimientos estudiadas anteriormente. Esto puede ser debido a la concentración que pueden sufrir los capsaicinoides en el pimiento debido a la pérdida de agua en la sobremaduración.

IV. 4. 1. 7. Cuantificación total de capsaicinoides mediante la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano.

Se ha estudiado la viabilidad de la cuantificación de los capsaicinoides totales presentes en muestras de pimientos mediante la técnica de espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS). Se pretende demostrar que esta técnica puede ser una herramienta útil para la determinación rápida y exacta de la concentración total de capsaicinoides presentes en muestras de pimientos.

Para ello, en primer lugar se ha realizado una calibración con todas las muestras de maduración que han sido estudiadas en este apartado del trabajo (salvo de aquellas que no se disponía de cantidad suficiente para realizar el análisis mediante NIRS).

Las distintas muestras que han sido estudiadas en este apartado han sido analizadas en el equipo FOSS XDS. De cada muestra se ha obtenido su espectro Vis-NIR, desde longitudes de onda de 400 a 2500 nm, medido en intervalos de 0,5 nm.

Una vez obtenido el espectro de cada muestra, se ha aplicado la técnica de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) con el programa Unscrambler 7.5. Las correlaciones se han intentado en primer lugar con el espectro completo obtenido y posteriormente, se tenía previsto el estudio de zonas concretas del espectro, con el fin de reducir las zonas a analizar.

El resultado empleando todo el espectro se muestra en la figura 79. Para obtener este resultado han sido necesarios un total de 20 componentes principales. Las contribuciones de cada una de las longitudes de onda a estos componentes principales han sido analizadas y se ha comprobado que no hay zonas del espectro que contribuyan de manera más significativa que otras, por lo que el análisis multivariante por zonas del espectro no se ha llevado a cabo.

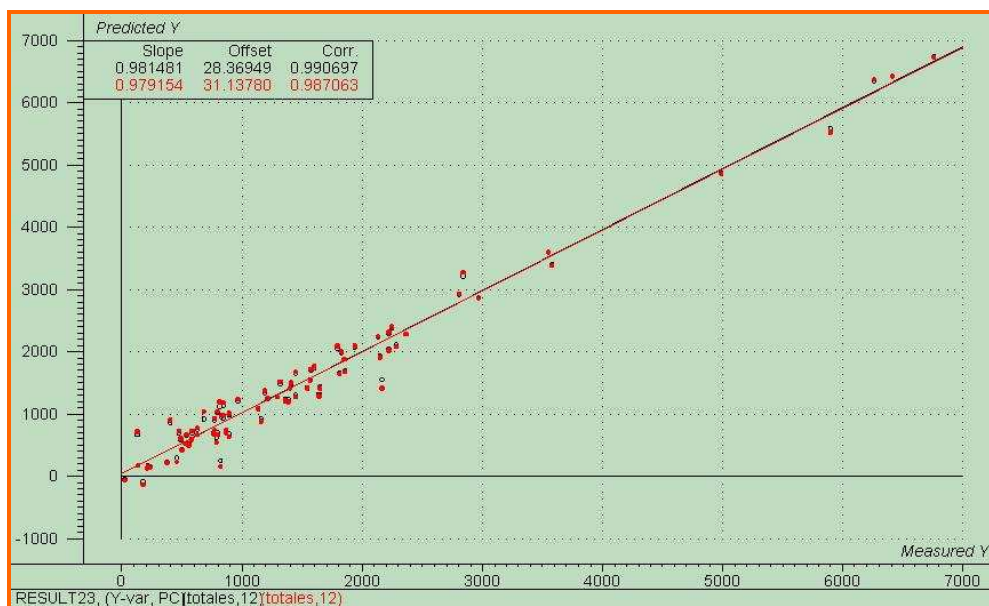


Figura 79: Correlación obtenida entre el valor total de capsaicinoides y el valor predicho por el modelo con todas las muestras analizadas.

Se observa (figura 79) que la correlación que se obtiene entre el valor total de capsaicinoides y el valor predicho por el modelo es muy elevada (99,07 %). Como puede comprobarse la mayoría de los datos se encuentran al inicio de la recta de regresión (concentraciones de capsaicinoides más bajas), existiendo algunos valores por encima (concentraciones de capsaicinoides mayores, que corresponden a ciertas muestras de placenta del pimiento Bolilla).

Con el fin de encontrar una correlación que se pueda aplicar a la mayoría de las muestras, eliminando la distorsión que puedan producir en la regresión aquellas muestras de valores de pungencia especialmente altos, se ha recalculado la regresión para los valores anteriores, obviando las muestras que presentan una cantidad muy elevada de capsaicinoides. Se han tomado de nuevo 20 componentes principales y los resultados obtenidos aparecen en la figura 80.

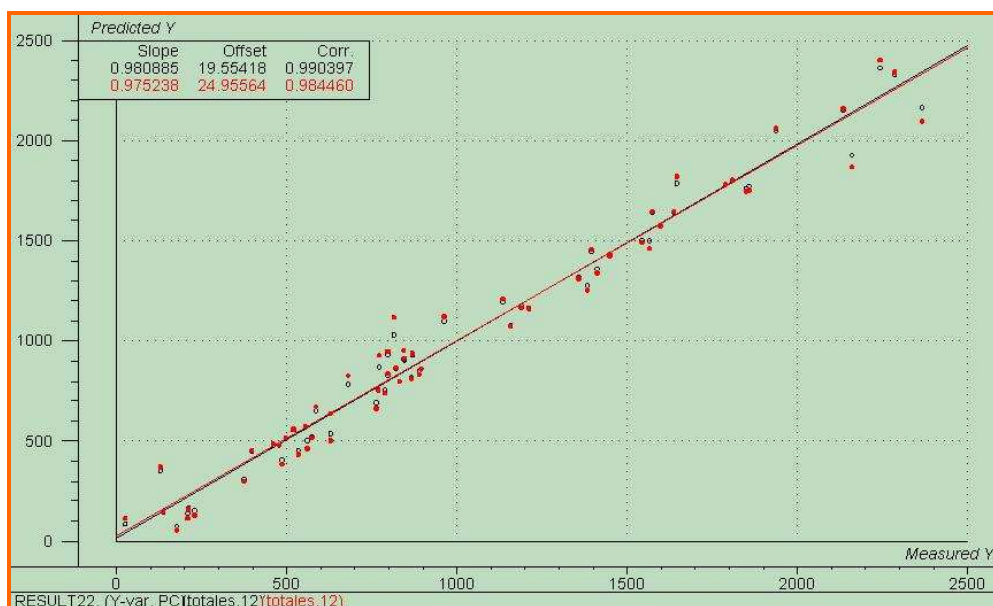


Figura 80: Correlación obtenida entre el valor total de capsaicinoides y el valor predicho por el modelo con todas las muestras analizadas menos las placentas del pimiento Bolilla.

Se observa en este caso (figura 80) que la correlación que se obtiene entre el valor real de concentración de capsaicinoides y el predicho por el modelo es similar al caso anterior. En este caso se obtiene una correlación del 99,04 %. En este segundo caso también se ha evaluado la posibilidad del empleo de zonas concretas del espectro Vis-NIR, pero al igual que en el caso anterior, no se han encontrado zonas del espectro con contribuciones significativamente más importantes que otras. El objetivo de este estudio era la posible utilización de espectrómetros NIR de espectro más reducido (o incluso sistemas de filtros) que el empleado en este estudio en la determinación de capsaicinoides.

De todas formas, se comprueba que con el empleo de esta técnica se podría realizar la cuantificación de capsaicinoides totales presentes en muestras de pimientos, siempre que el equipo se calibre correctamente.

IV. 4. 1. 8. Conclusiones.

El interés de este trabajo por un lado es aportar información acerca de que variedades son más interesantes a la hora de producir capsaicinoides para aplicaciones en la alimentación o en el aislamiento de compuestos naturales. Por otro lado interesa conocer en que momento de la maduración del pimiento el contenido en capsaicinoides es mayor, para decidir que momento es el más idóneo para realizar la recolección y tener frutos con el mayor contenido en capsaicinoides posible.

Se ha observado para todas las variedades de pimientos estudiadas, que la cantidad de capsaicinoides totales presente en el pimiento aumenta gradualmente hasta un tiempo, que está comprendido entre los 30 y los 60 días de maduración del fruto, según la variedad, la vejez de la planta o si se considera el pimiento o la placenta. A partir de esta fecha en la que la concentración de capsaicinoides es máxima, la concentración comienza a disminuir, en unos casos bruscamente, y en otros casos de una manera mucho más escalonada. Esta disminución en la concentración de capsaicinoides se achaca a la acción de unas enzimas presentes en los pimientos que son las peroxidasas, cuya función es la biodegradación de estos compuestos, como ya se ha comentado en el apartado I.3.3.

Por lo tanto, el momento óptimo de recolección del fruto para que la concentración de capsaicinoides fuera máxima, corresponde a este momento comprendido entre los 30 y 60 días de maduración del fruto. Por lo general en las variedades estudiadas, la fecha de 40 días de maduración es la más apropiada para la recolección del fruto. A partir de esta fecha el contenido en capsaicinoides del pimiento comienza a disminuir.

A los 40 días de maduración, el pimiento por lo general esta en el momento en el que se produce el viraje en el cambio de color del verde al rojo, por lo que esta circunstancia sería un buen indicador para la recolección del fruto. Se aconsejaría por tanto coger los pimientos en el momento que estos comienzan a colorear o justamente después que hayan perdido la tonalidad verdacea.

Con respecto a la edad de la planta, se ha observado que por lo general, en las plantas adultas el contenido en capsaicinoides suele aumentar. En este estudio hemos tenido un caso en el que no se ha producido esta circunstancia, que ha sido con la placenta del pimiento Bolilla. De todas formas parece que la influencia de la edad de la planta no es el único factor que va a influir en la síntesis de los capsaicinoides, participando en ésta otros factores como los ambientales, los genéticos o los de defensa frente a agresiones.

Con respecto a la variedad a cultivar hay que tener en cuenta varios factores como pueden ser:

- Factores genéticos: hay variedades y especies de pimientos que presentan unos niveles de capsaicinoides mayores otras (pimiento Bolilla en este estudio).
- Factores de productividad: hay variedades y especies que producen una mayor cantidad de pimientos por planta que otras (pimiento Extra Picante en este estudio).

El pimiento Cayena también ha presentado una buena productividad en este estudio. Se ha visto bastante afectado por la mosca blanca, pero esto no ha supuesto una disminución en la producción del pimiento. De todas formas debido al pequeño tamaño de la planta y al pequeño tamaño del pimiento, el peso total de pimiento que se obtiene de esta variedad no es muy elevado, por lo que respecto a este parámetro convendría plantar la variedad Extra picante.

- Factores de resistencia frente a plagas y enfermedades: hay variedades que se ven menos afectadas por las plagas de insectos, hongos o virus (pimiento Extra Picante en este estudio)

En el estudio que se ha llevado a cabo, se ha obtenido que el pimiento más picante es el pimiento Bolilla. Se ha dado la circunstancia que esta variedad de pimiento ha resultado ser mucho menos productiva que el pimiento Extra Picante, además de que se ve mucho más afectada por la plaga de mosca blanca. Los frutos de esta variedad en general no han tenido un buen aspecto a causa de las plagas que le han afectado, presentando abundante negrilla en sus frutos y en muchos casos malformaciones y aspectos no agradables a la vista del consumidor.

- Factores de resistencia frente a la temperatura: hay variedades que resisten menos las temperaturas extremas que otras (pimiento Cayena en este estudio)

En este caso en particular, el pimiento Cayena ha sido el pimiento que ha estado peor adaptado a las condiciones climáticas presentes en el invernadero. Ha sido una variedad de pimiento que no ha producido fruto en todo el periodo del invierno, dejándolos además de producir con los primeros calores del verano, bastante antes que las variedades bolilla y Extra Picante.

Con respecto al pimiento Extra Picante, ha sido la variedad menos picante de las tres que se han cultivado. De todas formas ha presentado una concentración de capsaicinoides bastante considerable, sobre todo en los primeros 30-40 días de crecimiento del fruto. Además ha resultado ser la variedad más productiva, con mucha diferencia, de las tres variedades cultivadas. También es la variedad más resistente frente a las plagas y enfermedades de las tres. Esta variedad de pimiento ha producido una gran cantidad de frutos (los más grandes), presentando la mayoría de ellos un excelente color, forma y textura, que los hacían muy atractivos a la vista. Por todas estas circunstancias, a pesar de ser la variedad menos picante de las tres, es la variedad que se aconsejaría producir debido a los demás factores que antes se han comentado.

Además, se ha comprobado que la técnica de espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) se puede utilizar para la cuantificación de capsaicinoides totales presentes en muestras de pimientos, siempre que se realice una correcta calibración del equipo. Será necesario ampliar el número de muestras de referencia tanto en variedades de pimiento, como en estados de maduración. Se piensa que posteriormente se podría abordar la determinación del nivel de capsaicinas en muestras intactas, de forma que se pueda aplicar al control de producción.

IV. 4. 2. Estudio del contenido en capsaicinoides de variedades de pimientos cultivadas en España.

IV. 4. 2. 1. Introducción.

En este apartado se ha llevado a cabo el estudio de la concentración de los 5 capsaicinoides mayoritarios (nordihidrocapsaicina, capsaicina, dihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina) presentes en distintas variedades de pimientos picantes cultivadas en España.

Los pimientos picantes han sido obtenidos de mercados, huertos, del invernadero del Centro de Investigación y Formación Agraria (CIFA) de Chipiona y de plantas ornamentales de pimientos.

Por los mismos motivos que en el apartado anterior, la técnica de extracción seleccionada para realizar este estudio ha sido la extracción asistida por ultrasonidos y el método cromatográfico empleado ha sido el desarrollado con la columna monolítica **Chromolith Performance RP-18e** (100 mm x 4,6 mm).

Se han estudiado 16 variedades de pimientos, recolectadas en su estado óptimo de madurez. Los resultados de concentración vienen expresados en $\mu\text{mol/kg}$ de pimiento fresco.

IV. 4. 2. 2. Procedimiento experimental.

Muestra.

Los pimientos fueron pelados separándoles el pedúnculo y las pepitas. Únicamente el pericarpio y la placenta del pimiento han sido estudiados. Tanto el pericarpio como la placenta han sido triturados con una batidora convencional, hasta que se obtuvo una muestra homogénea para el análisis. Las muestras trituradas obtenidas se han conservado en el congelador a $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

Las 16 muestras de pimientos que se han utilizado en este estudio han sido las siguientes:

- M-1:** Pimiento Bolilla 1 "*Capsicum annuum*".
- M-2:** Pimiento Bolilla 2 "*Capsicum annuum*".
- M-3:** Pimiento Largo 1 "*Capsicum annuum*".
- M-4:** Pimiento Largo 2 "*Capsicum annuum*".
- M-5:** Pimiento Largo 3 "*Capsicum annuum*".
- M-6:** Pimiento Pera Grande 1 "*Capsicum annuum*".
- M-7:** Pimiento Pera Grande 2 "*Capsicum annuum*".
- M-8:** Pimiento Pera Pequeña 1 "*Capsicum annuum*".

M-9: Pimiento Pera Pequeña 2 “*Capsicum annuum*”.

M-10: Pimiento Ornamental Amarillo “*Capsicum annuum*”.

M-11: Pimiento Cayena 1 “*Capsicum frutescens*”.

M-12: Pimiento Cayena 2 “*Capsicum frutescens*”.

M-13: Pimiento Cayena 3 “*Capsicum frutescens*”.

M-14: Pimiento Cayena 4 “*Capsicum frutescens*”.

M-15: Pimiento Campana 1 “*Capsicum chinense*”.

M-16: Pimiento Campana 2 “*Capsicum chinense*”.

Procedimientos de extracción.

En un matraz erlenmeyer de 50 mL se pesaba la cantidad de muestra de pimiento a extraer (\approx 1 gramo), y se añadía el volumen de disolvente de extracción (\approx 25 mL). Una vez adicionado el disolvente se introducían los matraces dentro del baño de ultrasonidos, el cual estaba a la temperatura a la que se fueran a realizar las extracciones (50 °C). Una vez finalizada la extracción, se procedía al enfriamiento del erlenmeyer. Una vez atemperado el extracto, se adicionaban 0,5 mL de patrón interno (\approx 1000 ppm de 2,5-dihidroxibenzaldehído) como corrector de volumen. Se tomaba una pequeña porción del extracto con una jeringuilla y se filtraba con un filtro de jeringa de nylon de 0,45 μ m para el posterior análisis cromatográfico. Los parámetros de extracción que se han empleado han sido los desarrollados en el capítulo IV.2.1.

Cromatografía líquida de alta eficacia.

Los análisis de los extractos de pimientos durante el estudio se llevaron a cabo empleando el método cromatográfico desarrollado en el apartado IV.1.2 para la columna monolítica **Chromolith Performance RP-18e** (100 mm x 4,6 mm).

IV. 4. 2. 3. Resultados.

Como se ha comentado anteriormente se han estudiado 16 variedades de pimientos cultivadas en España en su estado óptimo de maduración. Los resultados de concentración vienen expresados en $\mu\text{mol}/\text{kg}$ de pimiento fresco. Los resultados obtenidos para los 5 capsaicinoides mayoritarios (nordihidrocapsaicina, capsaicina, dihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina) vienen recogidos en la tabla 91. Todos los análisis han sido llevados a cabo por triplicado.

Muestra	n-DHC	Capsaicina	DHC	h-C	h-DHC	Total
M-1	141,19 \pm 2,46	579,03 \pm 10,02	528,65 \pm 8,46	22,47 \pm 0,40	43,43 \pm 0,69	1314,7
M-2	150,61 \pm 2,62	593,23 \pm 10,26	56,17 \pm 8,10	15,99 \pm 0,29	37,80 \pm 0,60	1303,8
M-3	34,91 \pm 0,61	190,30 \pm 3,29	140,75 \pm 2,25	7,65 \pm 0,13	14,98 \pm 0,24	388,6
M-4	114,10 \pm 1,98	554,38 \pm 9,59	440,74 \pm 7,05	9,67 \pm 0,17	37,39 \pm 0,60	1156,3
M-5	53,56 \pm 0,93	278,34 \pm 4,81	262,87 \pm 4,21	15,43 \pm 0,28	20,28 \pm 0,32	630,5
M-6	13,34 \pm 0,23	60,08 \pm 1,04	52,64 \pm 0,84	n.d.	3,52 \pm 0,05	129,6
M-7	30,57 \pm 0,53	130,20 \pm 2,25	88,71 \pm 1,42	5,36 \pm 0,10	13,22 \pm 0,21	268,1
M-8	238,49 \pm 4,15	1539,10 \pm 26,62	1048,80 \pm 16,78	66,67 \pm 1,21	82,76 \pm 1,32	2975,8
M-9	55,15 \pm 0,96	282,54 \pm 4,89	195,41 \pm 3,12	9,87 \pm 0,18	19,77 \pm 0,31	562,7
M-10	329,98 \pm 5,74	974,61 \pm 16,86	1070,74 \pm 17,13	34,45 \pm 0,62	52,37 \pm 0,84	2462,2
M-11	271,74 \pm 4,73	800,93 \pm 13,85	857,83 \pm 13,72	78,24 \pm 1,42	95,60 \pm 1,53	2104,4
M-12	143,10 \pm 2,49	1956,81 \pm 33,85	1394,18 \pm 22,30	64,48 \pm 1,17	50,99 \pm 0,81	3609,6
M-13	198,16 \pm 3,45	706,09 \pm 12,21	779,58 \pm 12,47	47,96 \pm 0,87	56,93 \pm 0,91	1788,7
M-14	451,46 \pm 7,85	1151,76 \pm 19,92	1404,00 \pm 22,46	71,28 \pm 1,29	156,06 \pm 2,50	3234,6
M-15	24,36 \pm 0,42	158,88 \pm 2,75	95,39 \pm 1,52	10,80 \pm 0,19	10,94 \pm 0,17	300,4
M-16	54,00 \pm 0,94	198,64 \pm 3,43	196,23 \pm 3,14	12,50 \pm 0,22	20,61 \pm 0,33	482,0

Tabla 91: Cantidad de capsaicinoides (μmol) por kilogramo de pimiento fresco en las 16 muestras analizadas ($n = 3$). (n. d.: no detectado).

A la vista de la tabla 91 se observa que la variedad de pimiento más picante es la 12. Además, se observa por lo general, que la capsaicina es el capsaicinoide mayoritario en la mayoría de las variedades picantes de pimientos (figura 81), salvo en algunas como el caso de las variedades de pimientos 10, 11, 13 y 14, cuyo capsaicinoide mayoritario es la dihidrocapsaicina (figura 82). Se observa que las variedades que poseen mayor cantidad de dihidrocapsaicina que de capsaicina son, por lo general, de las variedades más picantes de pimientos estudiadas.

Se observa además, que entre las variedades más picantes de pimientos se encuentran por general los pimientos tipo “Cayena”.

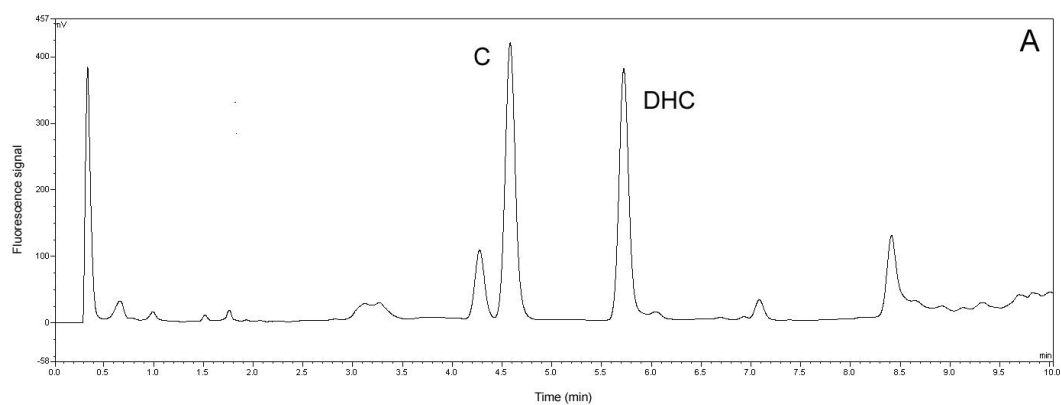


Figura 81: Variedad de pimiento que posee mayor cantidad de capsaicina (C) que de dihidrocapsaicina (DHC).

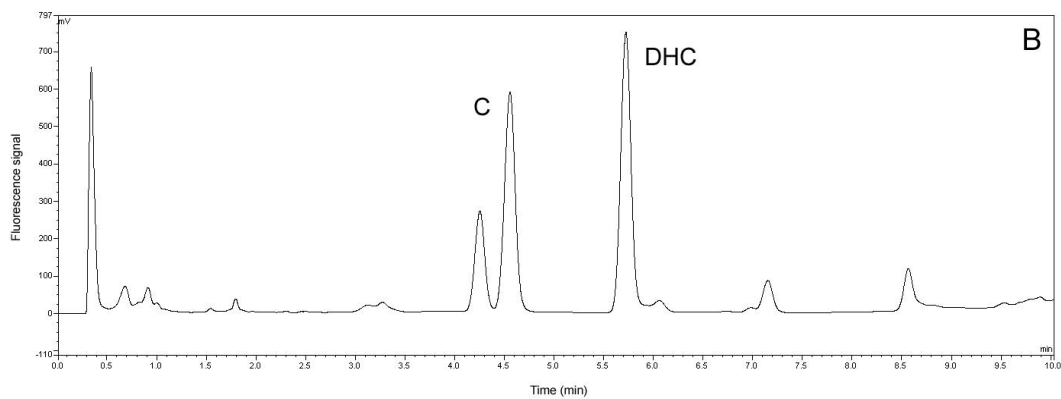


Figura 82: Variedad de pimiento que posee mayor cantidad de dihidrocapsaicina (DHC) que de capsaicina (C).

IV. 4. 3. Estudio del contenido en capsaicinoides de alimentos elaborados a partir de pimientos picantes.

IV. 4. 3. 1. Introducción.

En este apartado se ha llevado a cabo el estudio de la concentración de los 5 capsaicinoides mayoritarios (nordihidrocapsaicina, capsaicina, dihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina) presentes en distintos alimentos elaborados a partir de pimientos picantes como son pimentones, pimientos secos molidos, ketchups y distintas variedades de salsas picantes. Estos alimentos picantes han sido obtenidos en supermercados y tiendas.

Al igual que se ha utilizado en el apartado IV.4.2., el método de extracción que se ha empleado a la hora de realizar el análisis del contenido en capsaicinoides de alimentos elaborados a partir de pimientos picantes ha sido la **extracción asistida por ultrasonidos**, debido al gran número de extracciones que se tenían que realizar.

De igual manera, se ha empleado el método cromatográfico desarrollado con la columna monolítica **Chromolith Performance RP-18e** (100 mm x 4,6 mm), por los mismos motivos que se comentaron en el apartado anterior.

Se han estudiado 10 variedades de pimientos secos molidos, 19 tipos distintos de salsas, 4 pimentones y 4 ketchups picantes. Los resultados de concentración vienen expresados en $\mu\text{mol/kg}$ de alimento.

IV. 4. 3. 2. Procedimiento experimental.

Muestra.

La gran mayoría de las muestras utilizadas han sido obtenidas en supermercados y tiendas. Solamente algunas muestras de pimientos secos molidos han sido proporcionadas por agricultores u otros medios, como son los pimientos provenientes de Burkina Faso.

Las muestras que se han analizadas han sido las siguientes:

☛ Pimientos secos molidos picantes:

- 1: Pimiento Bolilla (*Capsicum annuum*).
- 2: Pimiento Cayena 1 (*Capsicum frutescens*).
- 3: Pimiento Cayena 2 “Carmencita” (*Capsicum frutescens*).
- 4: Pimiento Cayena 3, “Hacendado” (*Capsicum frutescens*).
- 5: Pimiento Cayena 4 (*Capsicum frutescens*).
- 6: Pimiento Largo (*Capsicum frutescens*).
- 7: Pimiento Campana (*Capsicum chinense*).
- 8: Pimiento de Burkina Faso Pequeño (*Capsicum frutescens*).
- 9: Pimiento de Burkina Faso Mediano (*Capsicum frutescens*).
- 10: Pimiento de Burkina Faso Grande (*Capsicum frutescens*).

☛ Pimentones picantes:

- 11: Pimentón “Carmencita” bote.
- 12: Pimentón “Carmencita” tarro.
- 13: Pimentón “Carrefour”.
- 14: Pimentón “Hacendado”.

☛ Ketchups picantes:

- 15: Ketchup “Prima”.
- 16: Ketchup “Calvé”.
- 17: Ketchup “Carrefour”.
- 18: Ketchup “Hacendado”.

☛ Salsas picantes:

- 19: Salsa para Tacos “Old el Paso” (3,5 % de pimiento Chili).
- 20: Salsa Guacamole “Old el Paso” (con pimientos Jalapeños).
- 21: Salsa Charra “Old el Paso” (1,8 % de pimiento Jalapeño).
- 22: Jalapeños cortados “Old el Paso” (53,5 % de pimiento jalapeño).
- 23: Salsa Chili picante “Heinz” (0,8 % de Chilis).
- 24: Salsa Taco suave “Texmex” (0,42 % de pimiento Jalapeño).

- 25: Salsa Fajita suave “Texmex”.
- 26: Salsa Guacamole picante “Texmex” (con pimientos Jalapeños).
- 27: Salsa de Ají “Indio Bravo” (con Ají).
- 28: Salsa Verde de Tabasco “Mc Ilhenny Company” (con pimientos jalapeños).
- 29: Salsa picante de Tabasco “Mc Ilhenny Company” (con pimientos jalapeños).
- 30: Mojo Rojo picante “Guachinerfe”.
- 31: Ají casero con chochos “Snob”.
- 32: Salsa de Ají picante “Gourmet Latino” (con pulpa de Ají picante).
- 33: Ají Criollo “Gourmet Latino” (con Ají picante molido).
- 34: Salsa China agridulce y picante “Man Fong” (con Guindillas).
- 35: Salsa mejicana verde “Costeña”.
- 36: Salsa picante “China Town”.
- 37: Carne de pimiento Choricero “J. R. Suarez Monedero S. L.”.

Procedimientos de extracción.

En un matraz erlenmeyer de 50 mL se pesaba la cantidad de muestra de alimento a extraer (0,2-2 gramos en función de lo picante que fuese el alimento), y se añadía el volumen de disolvente de extracción (\approx 25 mL). Una vez adicionado el disolvente se introducían los matraces dentro del baño de ultrasonidos, el cual estaba a la temperatura a la que se realizaron las extracciones (50 °C). Una vez finalizada la extracción, se procedía al enfriamiento del erlenmeyer. Una vez atemperado el extracto, se adicionaban 0,5 mL de patrón interno (\approx 1000 ppm de 2,5-dihidroxibenzaldehido) como corrector de volumen. Se tomaba una pequeña porción del extracto con una jeringuilla y se filtraba con un filtro de jeringa de nylon de 0,45 μ m para el posterior análisis cromatográfico. Los parámetros de extracción que se han empleado han sido los siguientes:

Disolvente: metanol

Temperatura: 50 °C

Potencia: 360 W

Volumen de disolvente: 25 mL

Cantidad de muestra: 0.2-2 gramos

Tiempo de extracción: 15 minutos

Cromatografía líquida de alta eficacia.

Los análisis de los extractos de pimientos durante el estudio se llevaron a cabo empleando el método cromatográfico desarrollado en el apartado IV.1.2 para la columna monolítica **Chromolith Performance RP-18e** (100 mm x 4,6 mm).

IV. 4. 3. 3. Resultados.

Como se ha comentado anteriormente se han estudiado distintos tipos de alimentos picantes. Los resultados de concentración vienen expresados en $\mu\text{mol/kg}$ de alimento. Los resultados obtenidos para los 5 capsaicinoides mayoritarios (nordihidrocapsaicina, capsaicina, dihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina) vienen recogidos a continuación (tablas 92, 93, 94 y 95). Todos los análisis han sido llevados a cabo por triplicado.

☛ Pimientos secos molidos picantes:

	<i>n-DHC</i>	<i>Capsaicina</i>	<i>DHC</i>	<i>h-C</i>	<i>h-DHC</i>	TOTAL
1	241,69 ± 4,21	3180,04 ± 55,01	1140,18 ± 18,24	409,82 ± 7,42	115,88 ± 1,85	5087,61
2	607,89 ± 10,58	3657,87 ± 63,28	2060,95 ± 32,97	497,44 ± 9,00	266,36 ± 4,26	7090,51
3	674,55 ± 11,74	7390,56 ± 127,86	3844,83 ± 61,52	853,61 ± 15,45	111,23 ± 1,78	12874,78
4	785,25 ± 13,66	10145,47 ± 175,5	4678,1 ± 74,85	1143,88 ± 20,7	298,17 ± 4,77	17050,87
5	138,18 ± 2,40	3168,1 ± 54,81	1036,53 ± 16,58	321,45 ± 5,82	98,4 ± 1,57	4762,66
6	24,49 ± 0,43	324,74 ± 5,62	146,99 ± 2,35	48,1 ± 0,87	9,83 ± 0,16	554,15
7	178,97 ± 3,11	1710,3 ± 29,59	1163,06 ± 18,61	247,1 ± 4,47	172,76 ± 2,76	3472,19
8	434,79 ± 7,56	9761,46 ± 168,87	4069,01 ± 65,10	733,43 ± 13,27	129,86 ± 20,08	15128,55
9	382,28 ± 6,65	4652,06 ± 80,48	2202,32 ± 35,23	699,38 ± 12,65	232,92 ± 3,73	8168,96
10	126,08 ± 2,19	6388,08 ± 110,51	2580,53 ± 41,29	362,2 ± 6,56	32,3 ± 0,52	9489,19

Tabla 92: Cantidad de capsaicinoides individuales y totales (μmol) por kilogramo de alimento en las 10 muestras de pimientos secos molidos picantes analizadas ($n = 3$).

Se observa (tabla 92), como era de esperar, que los capsaicinoides mayoritarios son la capsaicina y la dihidrocapsaicina. En estas 10 variedades de pimientos la capsaicina es el capsaicinoide mayoritario. Las muestras mas picantes han resultado ser la 4 (pimiento picante “Hacendado”) y la 8 (pimiento pequeño de Burkina Faso).

☛ Pimentones picantes:

	<i>n-DHC</i>	<i>Capsaicina</i>	<i>DHC</i>	<i>h-C</i>	<i>h-DHC</i>	TOTAL
11	29,75 ± 0,52	340,71 ± 5,89	193,46 ± 3,09	13,52 ± 0,24	4,55 ± 0,07	581,99
12	32,29 ± 0,56	355,96 ± 6,16	145,66 ± 2,33	64,8 ± 1,17	7,28 ± 0,17	605,99
13	22,68 ± 0,39	364,4 ± 6,30	222,3 ± 3,56	15,68 ± 0,28	35,66 ± 0,57	660,72
14	33,42 ± 0,58	370,28 ± 6,40	192,71 ± 3,08	25,69 ± 0,46	42,87 ± 0,68	664,97

Tabla 93: Cantidad de capsaicinoides individuales y totales (μmol) por kilogramo de alimento en las 4 muestras de pimentones picantes analizadas ($n = 3$).

Se observa (tabla 93) que los capsaicinoides mayoritarios son también la capsaicina y la dihidrocapsaicina, presentando la capsaicina una mayor concentración que la dihidrocapsaicina. Los pimentones comerciales que se han estudiado, presentan valores muy similares de pungencia. Estos valores son por lo general bastante inferiores que los obtenidos en los pimientos secos triturados, por lo que hace pensar que en la fabricación del pimentón se utilizan variedades de pimientos no demasiado picantes, o que en el proceso de la fabricación del pimentón, cierta parte de los capsaicinoides son degradados. La relación entre los capsaicinoides se mantiene de forma aproximada a la que aparece en los pimientos frescos, por lo que si se produce degradación, esta debe de afectar de manera similar a los 5 capsaicinoides estudiados.

☛ Ketchups picantes:

	<i>n-DHC</i>	<i>Capsaicina</i>	<i>DHC</i>	<i>h-C</i>	<i>h-DHC</i>	TOTAL
15	n.d.	2,56 \pm 0,04	1,51 \pm 0,02	n.d.	n.d.	4,07
16	n.d.	3,78 \pm 0,06	3,32 \pm 0,05	n.d.	n.d.	7,1
17	0,23 \pm 0,01	2,12 \pm 0,03	7,45 \pm 0,12	0,78 \pm 0,01	1,83 \pm 0,03	12,41
18	0,32 \pm 0,01	5,54 \pm 0,09	3,93 \pm 0,06	0,65 \pm 0,01	1,46 \pm 0,02	11,9

Tabla 94: Cantidad de capsaicinoides individuales y totales (μmol) por kilogramo de alimento en las 4 muestras de ketchups picantes analizadas ($n = 3$). (n.d.: no detectado).

Se han estudiado 4 variedades de ketchups picantes. Se observa que la concentración de capsaicinoides en los ketchups picantes es relativamente baja si la comparamos con la concentración que presentan las muestras anteriormente estudiadas. Esto es lógico, ya que la concentración de pimiento picante en el ketchup es muy pequeña en comparación con el resto de ingredientes utilizados en su preparación (tomate en su mayor proporción).

☛ Salsas picantes:

En el mercado se han encontrado un gran número de salsas picantes y de alimentos que presentan pimientos picantes entre sus ingredientes. Entre estos productos existen un gran número de empresas que las fabrican. Dentro de todas estas salsas picantes hay una gran variedad entre ellas, pudiendo casi decir que no hay una salsa picante igual que otra.

La mayoría de las salsas picantes y de los alimentos estudiados, poseen una proporción pequeña de pimientos picantes entre sus ingredientes (0,42-3,5 %). Por el contrario, existen salsas que están elaboradas en su mayor proporción por pimientos picantes triturados, lo que les da unas características de pungencia enorme a estos

alimentos. Este es el caso de las muestras 27, 28, 29, 33 y 36, las cuales son salsas muy picantes elaboradas para paladares poco sensibles.

	<i>n-DHC</i>	<i>Capsaicina</i>	<i>DHC</i>	<i>h-C</i>	<i>h-DHC</i>	TOTAL
19	0,18 ± 0,01	1,96 ± 0,03	2,05 ± 0,03	0,20 ± 0,01	0,17 ± 0,01	4,56
20	4,56 ± 0,08	9,06 ± 0,16	2,61 ± 0,04	n.d.	1,01 ± 0,02	17,24
21	2,14 ± 0,04	4,95 ± 0,08	5,49 ± 0,09	n.d.	0,65 ± 0,01	13,23
22	1,94 ± 0,03	8,40 ± 0,14	2,94 ± 0,05	0,09 ± 0,01	0,70 ± 0,01	14,07
23	n.d.	2,55 ± 0,04	1,60 ± 0,03	n.d.	0,62 ± 0,01	4,77
24	0,99 ± 0,02	7,31 ± 0,12	11,75 ± 0,18	n.d.	0,32 ± 0,01	20,37
25	0,41 ± 0,01	5,88 ± 0,10	9,14 ± 0,15	n.d.	0,19 ± 0,01	15,62
26	5,37 ± 0,09	8,11 ± 0,14	5,23 ± 0,08	0,65 ± 0,01	1,49 ± 0,02	20,85
27	1,90 ± 0,03	132,80 ± 2,30	37,44 ± 0,60	2,68 ± 0,05	0,81 ± 0,01	175,63
28	7,82 ± 0,14	62,63 ± 1,08	38,39 ± 0,61	1,37 ± 0,2	3,15 ± 0,05	113,36
29	16,64 ± 0,29	294,40 ± 5,09	144,90 ± 2,32	6,05 ± 0,11	3,94 ± 0,06	465,93
30	6,03 ± 0,10	22,92 ± 0,40	22,28 ± 0,36	1,05 ± 0,02	1,31 ± 0,02	53,59
31	1,53 ± 0,03	26,77 ± 0,46	8,52 ± 0,14	1,32 ± 0,02	0,94 ± 0,02	39,08
32	4,68 ± 0,08	85,59 ± 1,48	46,00 ± 0,74	7,73 ± 0,14	1,57 ± 0,03	145,57
33	0,72 ± 0,01	14,48 ± 0,25	7,25 ± 0,12	0,53 ± 0,01	0,30 ± 0,01	23,28
34	0,43 ± 0,01	3,40 ± 0,06	1,43 ± 0,02	n.d.	n.d.	5,26
35	3,68 ± 0,06	46,61 ± 0,80	25,46 ± 0,41	3,29 ± 0,06	1,09 ± 0,02	80,13
36	19,59 ± 0,34	187,98 ± 3,25	515,75 ± 8,25	111,65 ± 2,02	8,79 ± 0,14	843,76
37	n.d.	2,53 ± 0,04	2,28 ± 0,04	n.d.	n.d.	4,81

Tabla 95: Cantidad de capsaicinoides individuales y totales (μmol) por kilogramo de alimento en las 19 muestras de salsas picantes analizadas ($n = 3$). (n.d.: no detectado).

Se observa (tabla 95) que existe un intervalo enorme de concentración de capsaicinoides en las salsas y alimentos elaborados con pimientos picantes. De esta manera, tenemos salsas que son poco picantes (muestras 19, 23, 34 y 37) llegando a salsas muy picantes (muestras 29 y 36).

De igual manera, los capsaicinoides mayoritarios son la capsaicina y la dihidrocapsaicina. Se observa en algunas muestras, que el capsaicinoide mayoritario es la dihidrocapsaicina (muestras 19, 21, 24, 25 y 36), tal como se obtuvo con algunas variedades de pimientos en el apartado IV.4.2.

IV. 4. 3. 4. Conclusiones.

Se han estudiado y analizado distintos tipos de alimentos picantes (pimientos secos molidos, pimentones, ketchups, salsas y alimentos con pimientos picantes) que se comercializan en su mayoría en España.

Se observa, entre todos los alimentos analizados, que existe una gran disparidad en la concentración de capsaicinoides que presentan. De esta manera se pueden conseguir en el mercado desde alimentos y pimientos extremadamente picantes a muestras con suaves características de pungencia. Entre las muestras más picantes estudiadas están algunas variedades de pimientos secos molidos. También presentan concentraciones considerables de capsaicinoides los pimentones picantes que se comercializan en España, así como determinados tipos de salsas elaboradas en su mayor parte con pimientos picantes.

Además existen un gran número de salsas y alimentos que entre sus ingredientes aparecen, en pequeña proporción, distintos tipos de pimientos picantes. Estos alimentos presentan unas características de pungencia mucho más suaves que aquellos que están compuestos principalmente por pimientos picantes, pero proporcionan unas cualidades de sabor que son cada vez más demandadas por los consumidores.

Como era de suponer, la proporción de capsaicinoides que aparecen en los pimientos frescos estudiados, se mantiene en los alimentos que han sido analizados. De esta manera se observa que los capsaicinoides mayoritarios que aparecen en los alimentos son la capsaicina y la dihidrocapsaicina. Por lo general, la capsaicina aparece en mayor proporción que la dihidrocapsaicina, pero en ocasiones esta proporción se cambia, siendo la dihidrocapsaicina el capsaicinoide mayoritario, probablemente debido al uso de distintas variedades de pimientos.

V. CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral podemos llegar a exponer las siguientes conclusiones:

1. Desarrollo de dos métodos de CLAE en fase inversa para la determinación de capsaicinoides en pimientos.

Ha sido posible el desarrollo de un método reproducible ($DER < 2 \%$) y rápido de determinación de los principales capsaicinoides presentes en pimientos empleando una columna monolítica. Con este método se ha conseguido acortar el tiempo de análisis desde los 25 minutos necesarios con una columna RP-18 tradicional hasta los 7,21 minutos necesarios con el método desarrollado.

2. Desarrollo de tres metodologías novedosas de extracción de capsaicinoides en pimientos.

Es viable la aplicación de la extracción asistida por ultrasonidos para la recuperación de capsaicinoides a partir de muestras de pimientos. El método se desarrolla a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ durante un tiempo de 10 minutos. Ha resultado ser reproducible (repetibilidad $DER < 2,5 \%$ y reproducibilidad $DER < 3,0 \%$). Al poder desarrollar hasta 12 extracciones de forma simultánea, resulta ser un método adecuado para la extracción de una gran cantidad de muestras.

El empleo de la extracción mediante fluidos presurizados también ha resultado ser una técnica que permite la recuperación de los capsaicinoides a partir de muestras de pimiento. En este caso, el método desarrollado aplica una temperatura de $200 \text{ }^\circ\text{C}$ y 100 atmósferas de presión. El tiempo de extracción es de 5 minutos. Se trata de un método completamente automatizado que permite el tratamiento de la muestra con una mínima manipulación de la misma. Al tratarse de un método secuencial automatizado sería aplicable en aquellos casos en los que se deban variar de forma automatizada las condiciones de extracción. El método desarrollado presenta una repetibilidad y una reproducibilidad superior al 93 % para los 5 capsaicinoides analizados.

La extracción asistida por microondas también ha permitido la recuperación de los capsaicinoides, en este caso en un tiempo de 5 minutos trabajando a $125 \text{ }^\circ\text{C}$, no observándose degradación de los compuestos de interés hasta una temperatura de $150 \text{ }^\circ\text{C}$. El método desarrollado posee unos valores de reproducibilidad y repetibilidad similares a los ya comentados para los otros dos métodos (repetibilidad máxima del 3,04 % y reproducibilidad inferior al 6 %).