

Desarrollo de nuevas metodologías analíticas para la determinación de compuestos de interés biológico en pimientos

Máster Interuniversitario en
Agroalimentación, Perfil Investigador

Especialidad: Producción
Agroalimentaria



Tutores

Gerardo Fernández Barbero

Estrella Espada Bellido

Mercedes Vázquez Espinosa

Septiembre 2018



Facultad de Ciencias

**Desarrollo de nuevas metodologías analíticas
para la determinación de compuestos de
interés biológicos en pimientos**

Mercedes Vázquez Espinosa

Máster Interuniversitario en Agroalimentación

2017 – 2018



MEMORIA PRESENTADA POR
MERCEDES VÁZQUEZ ESPINOSA
PARA OPTAR AL MÁSTER INTERUNIVERSITARIO EN
AGROALIMENTACIÓN

Fdo: Mercedes Vázquez Espinosa



Dr. D. Gerardo Fernández Barbero y Dra. Dña. Estrella Espada Bellido, Profesores del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz

HACEN CONSTAR:

Que el presente trabajo de investigación titulado: **“Desarrollo de nuevas metodologías analíticas para la determinación de compuestos de interés biológicos en pimientos”**, ha sido realizado bajo su tutorización por Dña. Mercedes Vázquez Espinosa para optar al Máster Interuniversitario en Agroalimentación por la Universidad de Cádiz.

Y para que conste, expiden y firman el presente documento

En Puerto Real, a 21 de septiembre de 2018

Fdo.: Dr. D. Gerardo Fernández Barbero

Fdo.: Dra. Dña. Estrella Espada Bellido



*“Somos lo que comemos, pero lo que
comemos nos puede ayudar a ser mucha
más de lo que somos”*

Alice May Brock



AGRADECIMIENTOS

Este Trabajo Fin de Máster ha sido posible gracias al apoyo y ayuda de muchas personas, pues con cada uno de esos momentos, por pequeños que fuesen, he aprendido y me han hecho conseguir llegar hasta aquí. Es cierto que no ha sido nada fácil y que al principio lo veía muy complicado por falta de tiempo, pero al final lo he conseguido, aunque para ello, haya tenido que emplear parte de mi verano y días interminables. Es por esto que quiero agradecer a todas aquellas personas que han contribuido en este período intenso tanto académico como personalmente.

En primer lugar, agradecer a mis tutores Gerardo Fernández Barbero y Estrella Espada Bellido y a Marta Ferreiro González, por confiar siempre en mí y enseñarme y transmitirme todos sus conocimientos y el camino a seguir. Por dedicarme su tiempo y estar ahí ante todas las dificultades que han ido surgiendo.

Agradecer también al INIA (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria) por su apoyo financiero; así como al grupo de investigación AGR-122 y al IVAGRO (Instituto de Investigaciones Vitivinícolas y Agroalimentarias) por la cesión de las instalaciones y los equipos, sin los cuales no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

A mis amigos, tanto del mundo académico como personal y a mis familiares por repetirme tantas veces lo orgullosos que estaban de mí, y por estar siempre ahí animándome en los momentos de bajón y alegrándose de mis logros. Tengo que decir que aprender es mucho más sencillo cuando te diviertes.

Y, por último, pero no menos importante a mis padres, por su apoyo y presencia incondicional tanto en los buenos como en los malos momentos y porque gracias a ellos soy quien soy y estoy consiguiendo todos mis propósitos. Por todos los sabios consejos que me dan y por ser tan comprensivos cuando algo sale mal y ni yo misma me aguanto.



ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Summary	2
3. Introducción	3
3.1. Aspectos generales	3
3.2. Sustancias antioxidantes	4
3.3. Técnicas de extracción	7
3.4. Técnicas de separación, cuantificación e identificación	9
4. Materiales y métodos	11
4.1. Material biológico empleado	11
4.2. Disolventes y reactivos	12
4.3. Extracción asistida por ultrasonidos (UAE)	12
4.4. Extracción asistida por microondas (MAE)	13
4.5. Cromatografía líquida de ultra eficacia (UHPLC)	15
4.6. Cromatografía líquida de ultra eficacia acoplada a la espectrometría de masas de tiempo de vuelo (UHPLC-Q-ToF-MS)	17
4.7. Diseño estadístico de mezcla	18
4.8. Diseño de experimentos de Box-Behnken	19
5. Resultados y discusión	20
5.1. Extracción asistida por ultrasonidos (UAE)	20
5.2. Extracción asistida por microondas (MAE)	26
5.3. Aplicación a muestras reales	32
5.4. Comparación de ambos métodos de extracción	33
6. Conclusiones	34
7. Plan de difusión	34
8. Bibliografía	35
9. Apéndices	41



1. RESUMEN

Los pimientos son frutos pertenecientes a la familia *Solanaceae* y al género *Capsicum*. Se suelen utilizar como especies que añaden sabor y aroma a los alimentos, por lo que tienen una gran importancia comercial. Su principal característica es la acritud, causada por unos compuestos químicos conocidos como capsaicinoides. Los capsinoides son compuestos muy similares a los anteriores, con la única diferencia del enlace central, es decir, los capsaicinoides son amidas mientras que los capsinoides son ésteres. Ambos compuestos presentan las mismas actividades biológicas y efectos beneficiosos para la salud, como antioxidantes, anticancerígenos, antitumorales y analgésicos; además provocan un aumento de la energía del cuerpo y una disminución de la acumulación de grasa y de colesterol. Sin embargo, los capsinoides son mucho menos irritantes, no pungentes y más apetecibles para ser ingeridos de forma habitual en la dieta. A pesar de sus grandes beneficios, son compuestos que se degradan fácilmente y a gran velocidad, por lo que es necesario desarrollar técnicas de extracción y análisis que indiquen aquellas variedades de pimientos que presentan una mayor cantidad de los mismos.

En este trabajo, se ha desarrollado la extracción asistida por ultrasonidos (UAE) y por microondas (MAE) de capsinoides en pimientos Biquinho, usando métodos estadísticos multivariantes. En primer lugar, se llevó a cabo un diseño estadístico de mezcla, obteniendo como disolvente óptimo un 42% de metanol y 58% de acetato de etilo para ultrasonidos y un 100% de metanol para microondas. Una vez obtenido el disolvente óptimo, se realizó un diseño de experimentos de Box-Behnken con cuatro variables (tiempo, temperatura, pH y relación “masa de muestra/volumen de disolvente” (ratio)) y una respuesta (concentración de capsinato).

Para la separación y cuantificación de capsinoides se empleó un equipo de cromatografía UHPLC-DAD. En el caso del UAE, la única variable influyente fue el ratio; mientras que para la MAE no se obtuvo ninguna variable significativa. Estos resultados hacen referencia a que se tratan de dos técnicas bastante potentes, que permiten extraer la mayor cantidad de capsinato presente en las muestras de pimientos, independientemente de la variación de cualquiera de los factores analizados. Posteriormente, se efectuaron ensayos de repetibilidad y precisión intermedia, obteniendo coeficientes de variación inferiores al 5%, lo que indicaron que ambas técnicas son robustas y precisas. Finalmente, los métodos desarrollados se aplicaron a distintas variedades de pimientos, para determinar la cantidad de capsinoides.



2. SUMMARY

The peppers are fruits belonging to the family *Solanaceae* and the genus *Capsicum*. They are usually used as species that add flavor and aroma to foods, so they have a great commercial importance. Its main characteristic is the pungency, caused by chemical compounds known as capsaicinoids. The capsinoids are very similar compounds to the previous ones, with the only difference of the central link, that is, the capsaicinoids are amides whereas the capsinoids are esters. Both compounds present the same biological activities and beneficial effects for health as antioxidants, anticancer, antitumor and analgesic; they also cause an increase in the body's energy and a decrease in the accumulation of fat and cholesterol. However, capsinoids are much less irritating, non-pungent and more palatable to be ingested regularly in the diet. Despite its great benefits, capsinoids are compounds that degrade easily and at a high speed, so it is necessary to develop extraction and analysis techniques that indicate those varieties of peppers that have a greater amount of this type of compounds.

In this work, ultrasonic and microwave assisted extraction of capsinoids in Biquinho peppers have been developed, using multivariate statistical methods. Firstly, a statistical mixture design was carried out, obtaining 42% methanol + 58% ethyl acetate for ultrasound and 100% methanol for microwave as the optimum solvent. Once the optimal solvent was obtained, a design of Box-Behnken experiments with four variables (time, temperature, pH and ratio) and a response (capsiate concentration) was performed.

For the separation and quantification of the capsiate, an UHPLC-DAD chromatography equipment was used. In the case of ultrasound-assisted extraction, the only influential variable was the ratio; while for the microwave no significant variable was obtained. These results make reference to the fact that they are two quite powerful methods, which allow extracting the highest amount of capsiate present in the pepper samples, independently of the variation of any analyzed factor.

Subsequently, repeatability and intermediate precision tests were performed, obtaining coefficients of variation less than 5%, which indicated that both techniques are robust and precise. Finally, the developed methods were applied to different varieties of peppers, to determine the amount of capsiate.



3. INTRODUCCIÓN

3.1. Aspectos generales

Los pimientos son los frutos de las plantas del género *Capsicum*, que se originaron en las zonas tropicales y húmedas de América Central y del Sur, y pertenecen a la familia *Solanaceae* (Figura 1).¹ Existen varias especies de *Capsicum*, de las cuales solo tres, *C. annuum*, *C. frutescens* y *C. chinense*, son ampliamente cultivadas. Es una de las verduras y especies más antigua, cultivada y consumida en todo el mundo, especialmente en los países templados y semi-templados. India es el país de cultivo de pimientos más grande del mundo, donde se ha convertido en identidad cultural por el cultivo de una gran cantidad de variedades y el consumo local.²



Figura 1: Imagen de la variedad *Biquinho* de pimientos.

Tradicionalmente, los frutos maduros de las diferentes variedades de pimientos se han utilizado como colorantes naturales de alimentos, así como para agregar sabor y aroma. El color de cada variedad es variable, comenzando en verde o morado y cambiando a rojo, amarillo, naranja o marrón en la etapa de maduración. Dependiendo de la intensidad del sabor, la forma, el tamaño, el color y la textura, se utilizan en diversas preparaciones culinarias durante sus diferentes etapas de desarrollo. Los pimientos no sólo son valorados por sus atributos sensoriales de color, aroma y sabor, sino también tienen un papel significativo en las aplicaciones farmacéuticas y en la medicina.^{2,3}

La principal característica de los pimientos rojos es su acritud, causada por compuestos químicos conocidos como capsaicinoides. Además, esta fruta también es una fuente de otros compuestos nutracéuticos, incluidos minerales, vitaminas, ácidos fenólicos, flavonoides, ácido ascórbico y tocoferol, componentes bioactivos que promueven la salud en la dieta humana.⁴



3.2. Sustancias antioxidantes

Los antioxidantes se conocen como eliminadores de radicales libres, que son especies químicas generadas durante el proceso de oxidación, por una reacción química de transferencia de electrones. Son muy inestables debido a que presentan uno o más electrones desapareados, lo que les lleva a unirse a otras moléculas para conseguirlos, dando lugar a una reacción en cadena dentro de la célula, que puede llegar a producir alteraciones genéticas o aumentar el riesgo de padecer cáncer.⁵

Debido a la exposición a la radiación o a estrés, se generan especies de oxígeno reactivo (ROS), responsables de la modificación oxidativa de las membranas celulares. Aunque el mecanismo de defensa antioxidante endógeno previene tales daños oxidativos, cualquier desequilibrio en dicho mecanismo puede conducir a la sobreproducción de oxidantes. Los antioxidantes exógenos suministrados en la dieta permiten la prevención y el tratamiento de enfermedades causadas por dichas especies oxidantes. Además, se han utilizado como conservantes de alimentos para controlar su deterioro. Algunos de los antioxidantes naturales más conocidos de la industria alimentaria son los compuestos fenólicos, los carotenoides, tocoferoles o la vitamina C. Los capsaicinoides y capsinoides son dos familias de alcaloides lipofílicos naturales derivados de los pimientos del género *Capsicum*, considerados también buenos antioxidantes.⁶

3.2.1. Capsaicinoides

Los capsaicinoides son una clase de compuestos estructuralmente similares a la capsaicina, el componente activo principal de los pimientos picantes. Son los responsables de la sensación de ardor cuando se consumen alimentos que contienen picante o cuando entran en contacto con la piel.⁷ Su estructura presenta tres secciones claramente diferenciadas, el grupo vanillilo, el grupo carboxamida y la cadena alifática (Figura 2). Los mayoritarios son la dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina y capsaicina, llegando incluso al 90-98% de la cantidad total de capsaicinoides.⁸

<p>Grupo vanillilo</p> <p>Grupo carboxamida</p> <p>Cadena alifática</p>	Capsaicina	$R = (CH_2)_4CH=CHCH(CH_3)_2$
	Dihidrocapsaicina	$R = (CH_2)_6CH(CH_3)_2$
	Norhidrocapsaicina	$R = (CH_2)_5CH(CH_3)_2$

Figura 2: Estructura de los capsaicinoides.



Las diferencias estructurales entre los distintos capsaicinoides se encuentran en la cadena alifática, con una longitud de cadena de carbono variable, así como en diferentes grados de insaturación.⁹ Los capsaicinoides se biosintetizan mediante la condensación de ácidos grasos y vanillilamina y se acumulan en el tejido epidérmico de la placenta durante el desarrollo de la fruta.¹⁰ También se pueden encontrar en otras partes como en el pericarpio o las semillas. La acumulación de capsaicinoides aumenta durante la maduración del fruto, es decir, de la etapa de color verde a rojo. Dicha acumulación y pungencia está influenciada tanto por factores genéticos como ambientales, etapa de maduración de la fruta, especie, cultivo y condiciones climáticas.²

Es destacable la gran cantidad de efectos biológicos de relevancia farmacológica que poseen, como propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antimutagénicas, antioxidantes y antitumorales. También se han usado como analgésicos para tratar el dolor y para mejorar la termogénesis y el consumo de grasas.^{7,11} Sin embargo, a pesar de sus efectos beneficiosos, son compuestos altamente irritantes. Muchas personas se han adaptado a su picante y han llegado a disfrutar de la sensación, pero la exposición a altas dosis o a largo plazo tiene un efecto perjudicial sobre la mucosa gástrica y en última instancia sobre la salud.^{9,12}

3.2.2. Capsinoides

Son un grupo de compuestos análogos a los capsaicinoides, pero menos irritantes, no pungentes y más apetecibles, que presentan las mismas propiedades y beneficios para la salud. Ambos tienen estructuras químicas muy similares excepto por su enlace central, que se trata de un resto amida para los capsaicinoides (amidas de vanillilamina con ácidos grasos de cadena ramificada) mientras que para capsinoides se trata de un resto éster (ésteres de alcohol vanilílico con ácidos grasos). Esta diferencia estructural podría ser responsable de la menor estabilidad de los capsinoides, que se degradan más fácilmente.¹³ Hasta la fecha, se han aislado tres capsinoides mayoritarios en los pimientos, los cuales se muestran en la Figura 3.

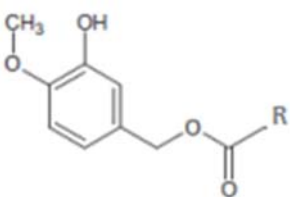
	Capsiato	$R = (CH_2)_4CH=CHCH(CH_3)_2$
	Dihidrocapsiato	$R = (CH_2)_6CH(CH_3)_2$
	Norhidrocapsiato	$R = (CH_2)_5CH(CH_3)_2$

Figura 3: Estructura de los capsinoides.



Estos compuestos se aislaron por primera vez de la fruta del cultivo de pimientos dulces “CH-19 Sweet”¹⁴⁻¹⁶ y su acritud es evaluada como aproximadamente 1000 veces menor. El número de carbonos de la cadena lateral, la presencia o ausencia de insaturaciones y las ramas de metilo ubicadas en las diferentes posiciones a lo largo de la cadena, determinan la estructura y, en consecuencia, su bioactividad.¹⁵ Las diferencias en la pungencia percibida entre los capsaicinoides y capsinoides están relacionadas con el sitio receptor vanilloide tipo-1 (TRPV1) de potencial de activación transitorio, que se encuentra en las terminaciones nerviosas sensoriales. Es el receptor responsable de la transducción del dolor y provoca la sensación de ardor que se siente después de la ingestión de capsaicinoides. Los capsaicinoides activan estos receptores en la lengua, mientras que los capsinoides tienen la capacidad de activarlos en el intestino con una potencia similar, lo que resulta en la ausencia de la sensación de ardor.¹⁷

A pesar de su menor acritud, exhiben propiedades farmacológicas beneficiosas para la salud similares a las de los capsaicinoides como analgésicos, antioxidantes, anticancerígenos, antiinflamatorios, antimicrobianos, antimutagénicos, pero sin los efectos secundarios como irritación o ardor.^{10,14,18} También hay que destacar que mejora el metabolismo de la glucosa y puede aumentar el gasto de energía y la temperatura corporal central, convirtiéndose así en una herramienta efectiva para los tratamientos antiobesidad, causante de enfermedades cardiovasculares, diabetes, accidentes cerebrovasculares y ciertos tipos de cáncer.^{16,17}

Aunque están presentes de forma natural en determinadas variedades de pimientos, la forma tradicional de producción por aislamiento de la fuente natural, ha sido abandonada debido a que es laboriosa e ineficaz en términos de rendimiento del producto. Por este motivo, la síntesis química es una alternativa. En el grupo de investigación AGR-122 se encuentra patentada y publicada la síntesis de este tipo de compuestos, mediante la realización de cuatro reacciones selectivas de elevado rendimiento: protección del grupo hidroxilo de la vainillina, reducción del carbonilo y posterior esterificación y desprotección de los capsinoides protegidos.^{19,20}

Finalmente, aunque se trata de una familia de compuestos químicos con grandes beneficios para la salud, ya mencionados anteriormente, y menos irritantes y pungentes para el organismo, se degradan fácilmente y a gran velocidad. Por este motivo, es necesario desarrollar técnicas de extracción y análisis que indiquen aquellas variedades de pimientos que presentan una mayor cantidad de capsinoides.



3.3. Técnicas de extracción

La extracción es una etapa muy importante para el aislamiento y separación de los compuestos de interés de la matriz sólida y no existe un método de extracción único y estándar. En este caso, se llevará a cabo una extracción sólido-líquido, que consiste en la transferencia selectiva de la especie de interés presente en la matriz sólida hacia una fase líquida, aprovechando las diferencias de solubilidad de los componentes de dicha mezcla en un disolvente adecuado.²¹ De esta manera, se obtienen dos partes claramente diferenciadas, la solución extraída en su disolvente (extracto) y el residuo sólido.

El proceso de extracción de las sustancias de interés depende mucho de las condiciones a las que se someta la muestra. Por ello, viene condicionado por diversos factores como son el método o el disolvente de extracción, la temperatura, el tiempo o el pH del medio. Como paso previo, es conveniente aplicar un proceso de liofilización y trituración o molienda de la muestra con la finalidad de conseguir una correcta homogeneización y elevar la superficie de contacto con el disolvente, mejorando así el rendimiento y el tiempo de extracción. Finalmente, la muestra debe conservarse en una cámara congeladora a -20 °C hasta su posterior análisis.

En los últimos años, ha aumentado el número de publicaciones centradas en el desarrollo de nuevos métodos de extracción de compuestos bioactivos de plantas.²² Entre las metodologías de extracción empleadas, la extracción asistida por ultrasonidos (UAE) y la extracción asistida por microondas (MAE) se consideran excelentes alternativas verdes y han sido empleadas ampliamente para la extracción de compuestos bioactivos. Esto es posible gracias a sus ventajas sobre los métodos convencionales, debido a su sencillez, mayor eficiencia y rendimiento, y porque son más ecológicos, rápidos, reducen costes de energía y permiten un mejor control de la temperatura.²³⁻²⁵

3.3.1. Extracción asistida por ultrasonidos (UAE)

El ultrasonido se aplica generalmente en medios sólidos/fluidos; las aplicaciones en sistemas de sólidos/gases no son frecuentes porque la absorción del aire dificulta su transmisión. Los ultrasonidos son ondas sonoras con una frecuencia superior a los 20 KHz, que se transmiten por el material con el que se encuentran en contacto. Al transmitirse a través de un fluido, la distancia promedio dentro de las moléculas se modifica, oscilando alrededor de su posición de equilibrio.



Durante el ciclo de compresión, la distancia intermolecular se acorta y se alarga nuevamente en el ciclo de expansión. Esto da lugar a la formación de burbujas mediante el fenómeno de la cavitación, las cuales aparecen, crecen y finalmente colapsan dentro del disolvente. Al colapsar, rompen las paredes celulares de la matriz sólida, lo que favorece la penetración del disolvente, la transferencia de masa y la liberación de los analitos, aumentando así el rendimiento de extracción.²⁶⁻²⁸

Los principales beneficios del uso de ultrasonidos en la extracción sólido-líquido incluyen la sencillez y bajo coste, una mejor conservación del medio ambiente, un aumento del rendimiento y eficiencia y una cinética más rápida, con un mínimo consumo de disolvente. También puede reducir la temperatura de funcionamiento, permitiendo la extracción de compuestos termolábiles.^{29,30} Por todo ello, es una técnica ampliamente extendida, que se ha utilizado recientemente para extraer una amplia variedad de compuestos de interés biológico en patatas,³¹ uvas³² o arándanos.³³

3.3.2. Extracción asistida por microondas (MAE)

Las microondas son ondas electromagnéticas (EM) no ionizantes de alta frecuencia, situadas entre el rango de radiofrecuencia e infrarrojos (de 0,30 a 300 GHz). Los sistemas de vaso cerrado generalmente se usan para la extracción en condiciones drásticas como alta temperatura, y constan de un horno, donde los recipientes de extracción se colocan sobre un plato giratorio, dispositivos para controlar la temperatura y la presión, y una serie de componentes electrónicos de potencia.³⁴

Consiste en un campo eléctrico y un campo magnético que oscilan perpendicularmente. Al exponerse a un campo electromagnético oscilante de frecuencia apropiada, las moléculas polares intentan alinearse en fase con el mismo, pero debido a las fuerzas intermoleculares, experimentan inercia y son incapaces de seguir el campo. Esto resulta en un movimiento aleatorio de las moléculas de la muestra, lo que genera calor. Al calentar selectivamente sólo las moléculas (principalmente del disolvente), es mucho más eficiente y homogéneo y el consumo de energía es mucho menor.^{35,36} Además, la migración de iones disueltos aumenta la penetración del disolvente en la matriz y, por lo tanto, facilita la liberación de los analitos.³⁴ Una de las diferencias es que, en lugar de realizar un calentamiento convencional, el microondas es una técnica “fría”, es decir, el calor aparece en el núcleo del objeto y se va extendiendo.



Recientemente, ha adquirido un gran desarrollo gracias a su alto rendimiento, la reducción tanto de la cantidad de disolventes empleados como del tiempo de extracción y el grado de automatización que permite.^{37,38} Al igual que la extracción asistida por ultrasonidos, ha sido empleada para extraer sustancias antioxidantes en una gran cantidad de matrices, tales como tomate,³⁹ aceite⁴⁰ o moras.⁴¹

3.4. Técnicas de separación, cuantificación e identificación

Una vez extraídos los compuestos de interés, es necesaria su separación, cuantificación e identificación. Tras consultar varias fuentes bibliográficas, se ha observado que las más ampliamente utilizadas para este fin son las técnicas cromatográficas.^{42,43} En este caso, se ha empleado la cromatografía líquida de ultra eficacia acoplada a un detector UV-Vis de fotodiodos alineados (UHPLC-DAD).

3.4.1. Cromatografía líquida de ultra eficacia (UHPLC)

En la cromatografía líquida, la separación se produce entre una fase móvil (el disolvente) y una fase estacionaria (el relleno de la columna). Una de las características esenciales del proceso cromatográfico es que, la fase móvil donde se encuentra disuelto el extracto, fluya a través de la fase estacionaria mediante la aplicación de una presión elevada.⁴⁴ En función de la naturaleza de los constituyentes de la muestra, éstos serán más afines a una de las dos fases, por lo que algunos de ellos quedarán más retenidos en la columna y otros saldrán más rápido de la misma, provocando así su separación. También influye en gran medida la naturaleza de ambas fases. Cuando la fase estacionaria es de naturaleza polar y la móvil apolar, se conoce como cromatografía en fase normal; por el contrario, cuando la fase estacionaria es apolar y la móvil es polar, cromatografía en fase reversa. A su vez, cuando la composición de la mezcla de disolventes permanece constante a lo largo de la etapa de elución, se denomina elución isocrática; mientras que cuando ésta varía, se conoce como elución en gradiente.⁴⁵ En este caso, se trabajará con una cromatografía en fase reversa y una elución en gradiente.

La transferencia de masa entre ambas fases debe ser rápida y frecuente para conseguir el equilibrio de solutos en el sistema cromatográfico, dando lugar así a una alta eficacia de la columna. Para ello, las distancias de difusión deben ser pequeñas y el área de contacto superficial entre las dos fases, grande.⁴⁴ Dos factores importantes son el tamaño de molécula, donde el analista no tiene control y la viscosidad del disolvente, que debe ser la mínima.⁴⁵



La UHPLC se trata de una técnica de separación basada en la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), pero que aprovecha los avances tecnológicos, utilizando columnas de relleno con partículas más pequeñas, con un diámetro inferior a 2 μm .

Gracias a esto, se consigue obtener una mejora tanto en la resolución del cromatograma como en los tiempos de retención, llegando a reducir el tiempo de análisis 10 veces. Los tiempos de retención dependen de un control termodinámico, mientras que la reducción en la anchura de pico de un control cinético. No obstante, esta técnica requiere trabajar a presiones mucho mayores para vencer la resistencia al flujo de disolventes y que la fase móvil fluya a través de la columna.^{46,47} Presenta varias ventajas entre las que destacan la óptima separación de los componentes de una muestra o el ahorro tanto de muestra como de tiempo. No obstante, presenta el inconveniente de que es necesario realizar una serie de ensayos previos para encontrar las condiciones óptimas de trabajo. Finalmente, se puede decir que esta técnica se ha empleado en gran cantidad de ocasiones para la separación de componentes de matrices tan diversas como arroz,⁴⁸ queso⁴⁹ o té verde.⁵⁰

3.4.2. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (MS) es una de las tecnologías más versátiles gracias a su alta sensibilidad y selectividad, y a su menor tiempo de respuesta respecto a otras técnicas. No obstante, hay que tener en cuenta que se trata de una técnica destructiva.⁵¹ Se basa en la detección de los pesos moleculares de los compuestos analizados, lo que permite obtener información sobre su estructura, naturaleza o composición y, por tanto, su identificación. Las moléculas presentes en la muestra a analizar se ionizan al pasar por un campo eléctrico y/o magnético, de manera que las especies portadoras de carga modificarán su trayectoria, se miden en un detector y se clasifican en función de su relación masa/carga.⁵² Normalmente, se acopla a métodos de separación, generalmente cromatográficos, que permiten separar las moléculas de interés antes de su llegada a la fuente de iones y así facilitar su detección y cuantificación.⁵³

Incluye diferentes componentes en serie (fuente de ionización, analizador y detector) y el proceso consiste en la introducción de la muestra a analizar, la posterior evaporación e ionización de las moléculas, la aceleración de los iones formados, su separación en función de la relación masa/carga y finalmente su detección.⁵³ Actualmente, es una de las técnicas más ampliamente utilizadas acoplada a equipos de cromatografía para la identificación de compuestos de interés en matrices como nueces,⁵⁴ miel⁵⁵ o moras.⁵⁶



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material biológico empleado

Para el estudio y desarrollo de los métodos de extracción se ha utilizado la variedad de pimiento Biquinho (*Capsicum chinense*), suministrada por el Banco de Germoplasma de Hortalizas de Zaragoza en el CITA de Aragón (Zaragoza, España). Tras la realización de unas pruebas preliminares, se eligió esta variedad por mostrar la presencia de la mayor cantidad de capsiato.

En primer lugar, se llevó a cabo la liofilización de las muestras, utilizando para ello un equipo Azbil Telstar Technologies, modelo LYOALFA (Terrassa, Barcelona, España). Este proceso consiste en congelar el fruto a una temperatura baja (aproximadamente $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$), seguido de una etapa de alto vacío en la que se elimina ese hielo por sublimación. Así se consigue eliminar toda el agua presente en el fruto para una mejor conservación y extracción. Posteriormente, se procedió a su trituración mediante un molinillo eléctrico convencional, aumentando así la superficie de contacto entre el fruto y el disolvente, y consiguiendo un mayor rendimiento. Finalmente, fueron almacenadas en una cámara congeladora a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Los métodos desarrollados se aplicaron a otras diez variedades de pimientos (de la misma generación y tamaño similar), sembrados en Octubre de 2013 y recolectados a mediados de marzo de 2014, en el Instituto Agronómico de Campinas (IAC) (Campinas, SP-Brasil), para determinar la cantidad de capsiato presente en las mismas (Figura 4).

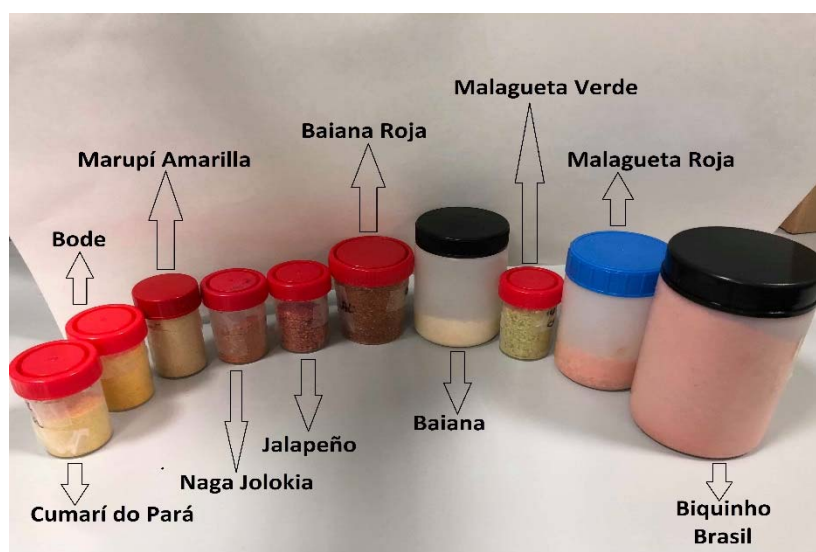


Figura 4: Variedades de pimientos analizadas.



4.2. Disolventes y reactivos

Los disolventes empleados individualmente antes de la realización del diseño estadístico de mezcla fueron metanol, etanol, acetona, acetato de etilo y acetonitrilo (Panreac, Barcelona, España) y hexano (Carlo Erba Reagents, Grupo Dasit, Sabadell, Barcelona, España), todos ellos de grado HPLC. El agua que se utilizó fue de calidad Milli-Q, obtenida mediante un sistema de purificación de agua Millipore (Bedford, Massachussetts, Estados Unidos). Una vez obtenido el disolvente óptimo, para la realización del diseño de Box-Behnken, fue necesario ajustar los valores de pH, por lo que se emplearon disoluciones preparadas de ácido clorhídrico y de hidróxido sódico (Panreac, Barcelona, España), ambos de grado “para análisis” y un pH-metro (Crison GLP 21, Barcelona, España).

Para las separaciones cromatográficas, los disolventes empleados fueron acetonitrilo, agua Milli-Q (citados anteriormente) y ácido acético (Merck, Darmstadt, Alemania); y para la cuantificación se utilizaron patrones de capsiao y dihidrocapsiao sintetizados tal y como describen Barbero y colaboradores.²⁰

4.3. Extracción asistida por ultrasonidos (UAE)

4.3.1. Equipo de extracción

La extracción asistida por ultrasonidos se llevó a cabo con una sonda UP 200S (Ultraschallprozessor, Dr. Hielscher, Berlín, Alemania) que permite el control y modificación de la amplitud y el ciclo, acoplada a un baño termostático con control de temperatura 7 Liter Refrigerated Circulator (PolyScience, Illinois, Estados Unidos) (Figura 5). El equipo dispone también de un vaso de doble pared, que permite mantener la temperatura del líquido de su interior.



Figura 5: Equipo para la extracción asistida por ultrasonidos (UAE).



4.3.2. Procedimiento de extracción

En el desarrollo de la extracción por ultrasonidos, el modo de operar fue el siguiente:

- En un “Falcon” de 50 mL se pesa la cantidad de muestra liofilizada a extraer (0,2 g aproximadamente) y se añade el volumen necesario del disolvente adecuado dependiendo del experimento a realizar.
- A continuación, se introduce el “Falcon” en el vaso de doble pared con la temperatura previamente programada para dicha extracción, colocando en su interior la sonda de ultrasonidos con la precaución de que no esté en contacto con las paredes ni el fondo del mismo. Se programa la amplitud y el ciclo, y se procede a realizar la extracción en dichas condiciones.
- Finalizada la extracción, se procede al enfriamiento si se hubiese realizado a altas temperaturas. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, el contenido del “Falcon” se centrifuga dos veces durante 5 minutos a 7500 rpm, trasvasando en ambos casos el sobrenadante a un matraz aforado de 25 mL y enrasando con el mismo disolvente empleado en la extracción.
- Por último, el extracto se trasvasa a un vial y se conserva en una cámara congeladora a -20 °C para su posterior análisis.

En el caso del **diseño estadístico de mezcla**, se fijó la temperatura a 40 °C, el ciclo a 0,5 s y se utilizó una potencia del 80%, un volumen de 10 mL y un tiempo de extracción de 10 minutos. La única variable a optimizar fue el disolvente de extracción con el fin de obtener la mezcla más óptima.

En el caso del **diseño de Box-Behnken**, las variables a controlar fueron el tiempo, la temperatura, el pH y la relación masa de muestra/volumen de disolvente (ratio); y se fijó el ciclo y la potencia a los mismos valores indicados anteriormente.

4.4. Extracción asistida por microondas (MAE)

4.4.1. Equipo de extracción

La extracción asistida por microondas se llevó a cabo con un equipo MARS 6 240/50 (One Touch Technolgy, CEM Corporation, Matthews, Carolina del Norte, Estados Unidos), mostrado en la Figura 6.



Figura 6: Equipo para la extracción asistida por microondas (MAE).

El sistema cuenta con:

- Un carrusel giratorio donde se colocan las cámaras de extracción.
- Unos imanes recubiertos de teflón que permiten la agitación de las muestras.
- Una sonda de control de temperatura.
- Un panel de control en la parte superior para seleccionar las condiciones de extracción de cada una de las experiencias (potencia, temperatura y tiempo).

4.4.2. Procedimiento de extracción

Al aplicar la extracción asistida por microondas, el modo de operar fue el siguiente:

- En primer lugar, se pesa la muestra liofilizada en una cámara de extracción (recipientes de teflón de alta presión). Al igual que antes, dicha cantidad se ha fijado en 0,2 gramos aproximadamente.
- Una vez pesada, se adiciona la cantidad de disolvente adecuada para cada experimento, se cierra convenientemente con ayuda de una llave de teflón para evitar posibles fugas de gases como consecuencia de las elevadas temperaturas empleadas y se colocan en el carrusel rotatorio. Es necesario completar un mínimo de 8 cámaras con el mismo volumen y disolvente, con el fin de evitar fluctuaciones de temperatura que puedan conllevar a error. Esto es debido a que el sensor mide la temperatura en todas las cámaras y ésta varía al pasar por una cámara vacía o con otro disolvente.
- Una vez preparadas todas las cámaras, se introduce el carrusel y se cierra el equipo dando comienzo al programa de extracción previamente configurado.
- Finalizada la extracción, se deja atemperar las muestras antes de su apertura. A continuación, el extracto se centrifuga dos veces durante 5 minutos a 7500 rpm, transvasando el sobrenadante en ambos casos a un matraz aforado de 25 mL y enrasando con el disolvente adecuado.



- Al igual que en el caso anterior, se trasvasa a un vial y se conserva en una cámara congeladora a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior análisis.

En el caso del **diseño estadístico de mezcla**, igual que anteriormente, la única variable a optimizar fue el disolvente de extracción y para ello se utilizó una temperatura de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, un volumen de 10 mL y una potencia de 800 W. El programa de extracción empleado fue el siguiente: una rampa de temperatura de 3 minutos para alcanzar la temperatura deseada, luego se mantiene esa temperatura durante 5 minutos para que se produzca la extracción de los compuestos de interés, y finalmente 25 minutos de enfriamiento para alcanzar la temperatura ambiente.

Para el **diseño de Box-Behnken**, las variables a controlar fueron el tiempo, la temperatura, el pH y la relación masa de muestra/volumen de disolvente (ratio). En este caso, se mantuvo el mismo programa de extracción, pero modificando el tiempo de mantenimiento en el que se produce la extracción y la temperatura, en función de cada experimento y la potencia empleada fue también de 800 W.

4.5. Cromatografía líquida de ultra eficacia (UHPLC)

4.5.1. Equipo de cromatografía

El equipo de cromatografía líquida Acquity Ultra Performance LC Class (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, Estados Unidos) (Figura 7), se empleó para la separación y cuantificación del capsiato y dihidrocapsiato. Este equipo puede alcanzar hasta 15000 psi de presión y dispone de un automuestreador (Acquity UPLC® H-Class), un administrador de disolventes cuaternario (Quaternary Solvent Manager), dos detectores (PDA (PDA e λ Detector) y FLR (FLR Detector)) y una columna.



Figura 7: Equipo de cromatografía UHPLC.

Se empleó un volumen de inyección de $3\text{ }\mu\text{L}$ y una longitud de onda de 280 nm en el detector PDA, ya que se corresponde con el máximo de absorción de los capsaicinoides.



La columna utilizada para el análisis fue una columna C-18 en fase reversa (Acquity UPLC BEH, Waters, Massachusetts, Estados Unidos), con unas dimensiones de 2,1 mm x 100 mm, un tamaño de partícula de 1,7 μm y a una temperatura de 50 $^{\circ}\text{C}$.

4.5.2. Procedimiento de separación

Para llevar a cabo la separación del capsiato y dihidrocapsiato presente en las muestras de pimientos, se empleó un método en gradiente, donde en primer lugar, hubo que preparar los dos disolventes a utilizar. El disolvente A consistió en agua Milli-Q y el disolvente B fue acetonitrilo, ambos acidificados al 0,1% en ácido acético. Dichos disolventes fueron filtrados con un filtro de 0,22 μm (Nylon Membrane Filter, FILTER-LAB, Barcelona, España) y desgasificados en un baño de ultrasonidos (Elma S300 Elmasonic, Singen, Alemania). Se empleó un flujo de 0,8 mL/min y el método en gradiente mostrado en la Tabla 1. El cromatograma obtenido se puede observar en el Anexo III.

Tiempo (min)	0	0,5	1,60	1,95	2,45	2,80	3,00	4,00	6,00	6,30	8,30
%B	0	45	45	50	55	63	63	100	100	0	0

Tabla 1: Gradiente utilizado para la separación cromatográfica de capsinoides.

La separación de capsaicinoides ya ha sido estudiada previamente por el grupo de investigación AGR-122 y se ha adaptado el método utilizado a la separación de capsinoides.⁵⁷ De tal forma que este método es capaz de separar ambos tipos de compuestos. El cromatograma obtenido se puede observar en el Anexo IV.

La cuantificación de los compuestos de interés se realizó a partir de una recta de calibrado, usando como referencia patrones de capsiato y dihidrocapsiato sintetizados tal y como se ha mencionado anteriormente y mediante la preparación de patrones de concentración conocida entre 0,01 y 200 ppm. Las rectas de calibrado obtenidas fueron: $y = 2715,2076x - 526,9713$ / $y = 2498,4568x - 382,2437$, para capsiato y dihidrocapsiato respectivamente, ambas con un coeficiente de regresión lineal (R^2) de 0,9997.

También se calculó el límite de detección (LOD), así como el límite de cuantificación (LOQ), aplicando las siguientes fórmulas: $\text{LOD} = \frac{3 \cdot S_{\text{Blanco}}}{m}$ $\text{LOQ} = \frac{10 \cdot S_{\text{Blanco}}}{m}$



Donde m es la pendiente de la recta y S la desviación estándar del blanco. Se obtuvieron valores de $\text{LOD} = 0,079$ ppm y $\text{LOQ} = 0,265$ ppm para el capsiato y $\text{LOD} = 0,096$ ppm y $\text{LOQ} = 0,320$ ppm para el dihidrocapsiato.

4.6. Cromatografía líquida de ultra eficacia acoplada a la espectrometría de masas de tiempo de vuelo (UHPLC-Q-ToF-MS)

4.6.1. Equipo de identificación

Para asegurar que los compuestos que se están cuantificando son capsiato y dihidrocapsiato, se procedió a su identificación mediante un equipo de cromatografía líquida de ultra eficacia, acoplado a un espectrómetro de masas con cuadrupolo de tiempo de vuelo (Figura 8) (Xevo Acquity Ultra Performance LC Class, Waters, Massachusetts, Estados Unidos).

Este equipo consta de un automuestreador, un administrador de disolventes cuaternario y binario, un detector PDA y una columna. Al igual que en el caso anterior, se empleó una columna analítica C-18 en fase reversa (Acquity UPLC BEH C-18, Waters, Massachusetts, Estados Unidos), con unas dimensiones de 2,1 mm x 100 mm, y un tamaño de partícula de 1,7 μm .



Figura 8: Equipo UHPLC-Q-ToF-MS.

4.6.2. Procedimiento de identificación

En este caso, se utilizó agua Milli-Q como disolvente A y metanol como disolvente B, ambos acidificados al 0,1% con ácido fórmico y posteriormente filtrados y desgasificados. Se empleó un flujo de 0,5 mL/min y el gradiente de elución mostrado en la Tabla 2:

Tiempo (min)	0	0,85	1,60	1,95	2,45	2,80	3,00	6,00	8,00
%B	0	55	55	60	63	70	70	100	100

Tabla 2: Gradiente utilizado para la identificación cromatográfica de los capsinoides.



La determinación se llevó a cabo con una fuente de electrospray en modo de ionización positiva y bajo las siguientes condiciones: flujo de gas y temperatura de desolvatación = 850 L/h y 500 °C, flujo de gas y voltaje del cono = 10 L/h y 20 V, temperatura de la fuente = 150 °C y energía de colisión de la trampa = 4 eV. Los datos fueron recogidos en modo de barrido completo en $m/z = 100 - 1200$. Los iones moleculares $[M]^+$ para los capsinoides identificados en los pimientos presentaron las siguientes relaciones m/z : capsiato, 307; dihidrocapsiato, 309.

4.7. Diseño estadístico de mezcla

En algunos sistemas de extracción es conveniente utilizar mezclas de disolventes, que pueden ir desde mezclas binarias hasta mezclas terciarias o incluso mezclas multicomponentes, en lugar de disolventes puros. Uno de los aspectos más importantes es el papel de las interacciones disolvente-disolvente en la competencia para la solvatación de solutos. Mediante este método se pueden determinar cuáles de esas interacciones son significativas para extraer los compuestos de interés de la muestra.⁵⁸

Se trata de un diseño en el que el factor experimental a optimizar está formado por varios componentes. A su vez, dichos componentes no son independientes sino una combinación de todos ellos. De esta forma, la respuesta viene dada en función de las proporciones de los diferentes componentes de la mezcla. El espacio de diseño representa la región en la que los ensayos del experimento son factibles. Una mezcla con tres componentes, como la que se llevó a cabo en este trabajo, se puede visualizar usando una gráfica de diseño simple (Figura 9).

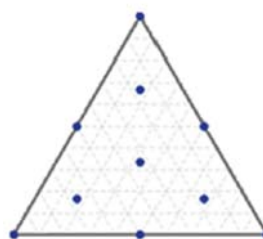


Figura 9: Representación gráfica del diseño de mezcla.

Los tres puntos en los vértices del triángulo corresponden a extracciones llevadas a cabo independientemente usando cada uno de los disolventes puros; los tres puntos intermedios en cada lado del triángulo corresponden a mezclas binarias 1:1 de dichos disolventes; el punto central representa una mezcla de los tres componentes a partes iguales; y, por último, el resto de puntos se refieren a mezclas ternarias que usan proporciones diferentes de los disolventes.^{59,60}



La principal ventaja de este diseño es que la región experimental de interés se define más claramente. Además, permite reducir el número de experimentos, realizar un análisis de las interacciones de los constituyentes de la muestra y proporcionar una mezcla óptima para mejorar varias respuestas en paralelo. Sin embargo, requiere de cierta experiencia estadística para la creación del diseño, los rangos de las variables en los experimentos y las restricciones a cumplir.⁶¹

4.8. Diseño de experimentos de Box-Behnken

Recientemente, las herramientas quimiométricas se han aplicado con frecuencia para la optimización de métodos analíticos, debido a la reducción del número de experimentos que deben ejecutarse, lo que resulta en un menor consumo de reactivos y tiempo, un ahorro energético y considerablemente menos trabajo de laboratorio.²⁴ Además, estos métodos permiten el desarrollo de modelos matemáticos para evaluar la significación estadística y relevancia de cada uno de los factores analizados, así como las interacciones que se establecen entre los mismos. Si existen efectos de interacción entre los factores, las condiciones óptimas indicadas por los estudios univariantes serán diferentes a los resultados de la optimización multivariante. Por lo tanto, cuanto mayor sean los efectos de interacción, mayor serán las diferencias encontradas.⁶²

Los diseños de experimentos de Box-Behnken son un tipo de diseño factorial de superficie de respuesta, que asegura la máxima información sobre la respuesta del sistema, reduciendo el número de experimentos con respecto a otros diseños. Para tres factores, la representación gráfica consiste en un cubo con un punto central y puntos en el centro de las aristas que lo forman, donde los ejes representan cada factor y sus vértices el valor máximo y mínimo de los mismos.⁶³ En este caso, implica la realización de 13 experimentos, como se observa en la Figura 10:

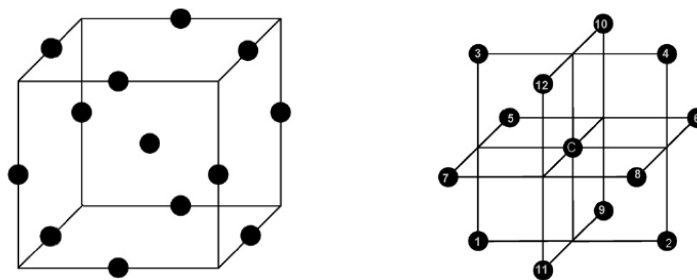


Figura 10: Representación gráfica del diseño de Box-Behnken para 3 factores.



Durante el procedimiento de optimización, existen dos tipos de variables: las repuestas, conocidas como variables dependientes, y los factores o variables independientes. Estas últimas pueden tomar tres posibles valores, codificados como -1, 0 y 1, en función de si se trata de su valor mínimo, medio o máximo, respectivamente.

La respuesta se relaciona con los distintos factores estudiados mediante el modelo polinómico mostrado en la Ecuación 1, donde Y es la variable respuesta, β_0 , β_i , β_{ii} y β_{ij} son los coeficientes de regresión para los términos de intersección, lineal, cuadrático e interacción, respectivamente; y por último i e j son las variables independientes codificadas que afectan a la respuesta. Estos coeficientes se determinan a partir del análisis de la varianza (ANOVA).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i \cdot x_i + \beta_{ii} \cdot x_i^2 + \sum_i \sum_{i=1}^k \beta_{ij} \cdot x_i x_j + r$$

Ecuación 1: Polinomio general de segundo orden del diseño de Box-Behnken.

Una de las principales ventajas de este diseño es que no contiene combinaciones en las que todos los factores están simultáneamente en sus niveles más altos o más bajos. Por tanto, son útiles para evitar experimentos realizados en condiciones extremas, que pueden conllevar a resultados insatisfactorios. Por el contrario, no están indicados para situaciones en las que es necesario saber las respuestas en los extremos, es decir, en los vértices del cubo.⁶³

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Extracción asistida por ultrasonidos (UAE)

5.1.1. Elección del disolvente óptimo de extracción

Para la elección del disolvente óptimo de extracción, se llevaron a cabo extracciones por duplicado con distintos disolventes (agua Milli-Q, acetonitrilo, metanol, etanol, acetona, hexano y acetato de etilo). Para dichas extracciones se fijó una temperatura de 40 °C, un tiempo de extracción de 10 minutos, una potencia del 80% y un volumen de 10 mL de cada uno de los disolventes. Estas condiciones iniciales fueron analizadas previamente para comprobar que eran válidas y se producía la extracción de capsiato, el capsinoide mayoritario del pimiento. En la variedad de pimientos estudiada no se encontró dihidrocapsiato. Los resultados se muestran en la Figura 11:

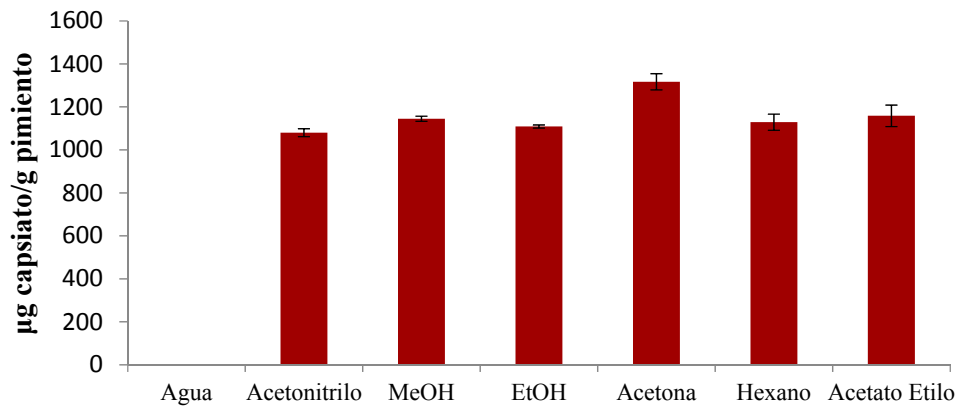


Figura 11: Evaluación del proceso de extracción con disolventes individuales (UAE).

Se puede observar que el mejor disolvente de extracción es la acetona, seguida del acetato de etilo y el metanol. En el caso del agua no se observa capsiato, ya que la cantidad extraída se encontró por debajo del límite de cuantificación. Por lo tanto, debido a su alta polaridad, no es un buen disolvente para la extracción de este tipo de compuestos, que presentan un anillo aromático y una cadena de ácido graso en su estructura. En el caso del hexano, se trata de un disolvente muy volátil por lo que se evapora una gran cantidad del mismo durante el proceso de extracción, provocando una disminución de la eficiencia. Además, presenta una polaridad inferior a la del capsiato lo que dificulta su extracción. Debido a las características tanto de polaridad como de afinidad, la acetona, el acetato de etilo y el metanol son los más adecuados para la extracción de los capsinoides presentes en el pimiento.

A continuación, estos tres disolventes se utilizaron para llevar a cabo un diseño estadístico de mezcla, que se realizó haciendo uso del programa estadístico Statgraphic Centurion (Versión XVII), utilizando para ello el modelo Simplex Centroides Ampliado con 10 experimentos, cuyos resultados se pueden ver en la Tabla 14 del Apéndice I. A partir de dichos resultados, se puede observar que algunas combinaciones de disolventes consiguen un aumento en la cantidad de capsiato extraída. A su vez, se analizaron distintos modelos matemáticos para explicar los resultados, validando cada uno de ellos mediante un análisis de la varianza (ANOVA), tal y como se observa en la Tabla 3:

Modelo matemático	<i>p</i> -Valor	Coefficiente R ² (%)	Valor <i>F</i>
Lineal	0,7579	7,6159	0,29
Cuadrático	0,0051	96,5392	22,32
Cúbico	0,0250	96,7146	14,72

Tabla 3: ANOVA de los modelos matemáticos del diseño estadístico de mezcla (UAE).



Se puede observar que tanto el modelo cuadrático como cúbico son significativos, ya que presentan un p -Valor $< 0,05$ y un alto valor de F así como del coeficiente R^2 ; mientras que el modelo lineal no es significativo. Además, en ambos modelos matemáticos, cuadrático y cúbico, se observó la misma mezcla óptima de disolventes, cuya región se muestra en la Figura 12: **42% MeOH + 58% Acetato de etilo**

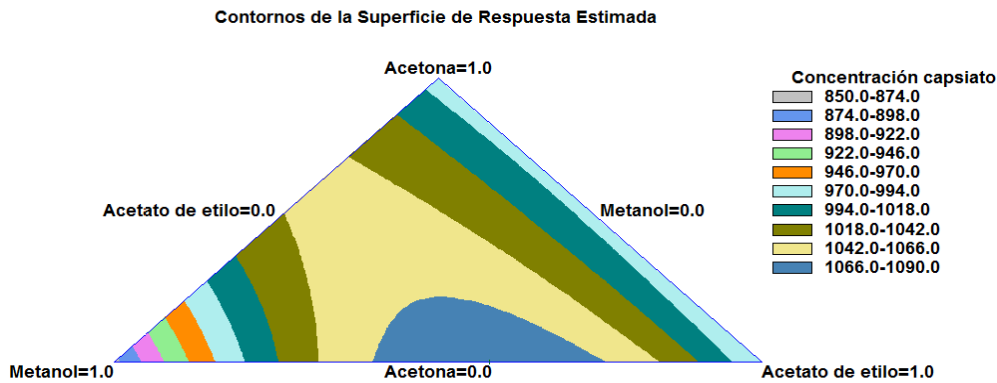


Figura 12: Diagrama para el diseño de mezcla (UAE).

Los resultados obtenidos son coherentes. Barbero y col. realizaron un estudio similar de la extracción de capsainoides con metanol, etanol, acetonitrilo, acetona, acetato de etilo y agua, obteniendo como resultado óptimo de extracción un 100% de metanol.⁸ Posteriormente, en 2018 Chan KK y col.⁹ ensayaron también los disolventes metanol, etanol y acetonitrilo para la extracción de capsainoides y verificaron de nuevo que los mejores resultados eran obtenidos con metanol.

Debido a la menor polaridad de los capsainoides, teóricamente el disolvente óptimo de extracción debería tener una menor polaridad que el metanol. En este sentido, Lang Y y col. utilizaron un 100% de acetato de etilo para la extracción de capsainoides en pimientos¹⁴, pero no llevaron a cabo el desarrollo del método. Finalmente, tras la optimización que se ha realizado en este trabajo, se puede observar que, con esta técnica de extracción, lo más adecuado es emplear una combinación de ambos disolventes.

5.1.2. Selección de las condiciones óptimas del UAE

Una vez definido el mejor disolvente de extracción, se realizó un diseño de tipo Box-Behnken con cuatro variables independientes (tiempo, temperatura, pH y ratio) y una respuesta (concentración de capsiato). Para la optimización de dichas variables, se deben realizar 27 experimentos, cuyos resultados se muestran en la Tabla 16 del Apéndice II. En todos ellos, la cantidad de muestra pesada fue de 0,2 gramos y el disolvente empleado fue el optimizado previamente.



Para el tratamiento de los datos, también se utilizó el programa estadístico Statgraphic Centurión (Versión XVII). Los rangos utilizados para cada una de las variables se muestran en la Tabla 4:

FACTOR	INTERVALO UTILIZADO
Tiempo (min)	5 – 10 – 15
Temperatura (°C)	5 – 30 – 55
pH	2 – 5 – 8
Ratio (mL)	5 – 10 – 15

Tabla 4: Rango de las variables para las experiencias del diseño en UAE.

En primer lugar, se llevó a cabo el análisis de la varianza (ANOVA), con el objetivo de evaluar el efecto de cada una de las variables individualmente, así como las posibles interacciones entre ellas. En la Tabla 5, se puede observar el coeficiente estimado de la ecuación polinómica de segundo orden para cada uno de las variables e interacciones estudiadas y su *p*-Valor.

EFEECTO	COEFICIENTE ESTIMADO	<i>p</i> -VALOR
Tiempo	-0,9086	0,8777
Temperatura	-11,8656	0,0625
pH	-2,7079	0,6478
Ratio	15,9683	0,0172
Tiempo-Tiempo	5,3928	0,5455
Tiempo-Temperatura	13,9249	0,1894
Tiempo-pH	-1,0849	0,9155
Tiempo-Ratio	9,7581	0,3489
Temperatura-Temperatura	13,1515	0,1551
Temperatura-pH	-17,0777	0,1137
Temperatura-Ratio	-13,0114	0,2181
pH-pH	5,1621	0,5626
pH-Ratio	7,2104	0,4851
Ratio-Ratio	-7,9964	0,3745

*Tabla 5: Coeficiente estimado de la ecuación polinómica de segundo orden y *p*-Valor.*

Se considera que influyen de manera estadísticamente significativa sobre la respuesta, las variables o interacciones que presenten un *p*-Valor inferior a 0,05, a un nivel de confianza del 95%. Por tanto, se observa que la única variable que influye en la cantidad de capsiato extraída es el ratio, resaltada en la Tabla 5.



Para una comprensión más sencilla e intuitiva, estos resultados se pueden representar gráficamente mediante el diagrama de Pareto (Figura 13), donde se puede ver fácilmente la importancia de cada una de las variables e interacciones en orden decreciente. Aquellas variables o interacciones cuyos efectos estandarizados superen un valor de 2,17 se consideran significativas sobre la respuesta.

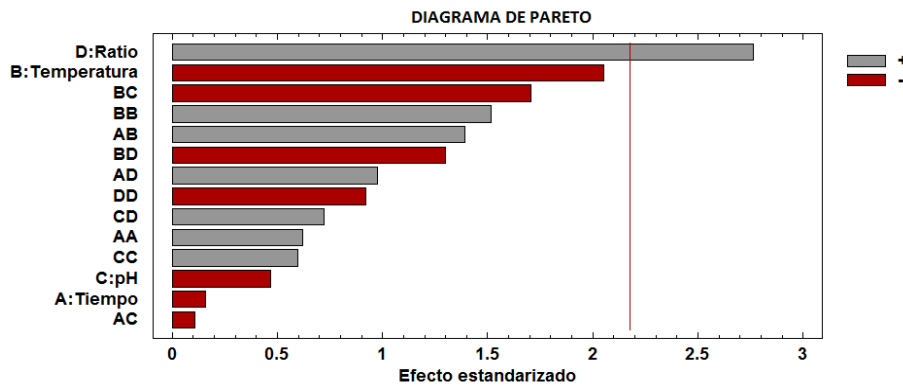


Figura 13: Diagrama de Pareto para la extracción asistida por ultrasonidos.

En este diagrama se observa de nuevo como la única variable significativa que influye sobre la respuesta es el ratio, aunque cerca se encuentra la temperatura. A su vez, las otras dos variables analizadas, pH y tiempo, prácticamente no tienen ningún efecto sobre la cantidad de capsaiato extraída.

También se observa el signo de cada efecto mediante los dos colores diferentes de las barras. Los signos positivos indican una relación directa entre el efecto y la variable respuesta, mientras que los signos negativos se refieren a una relación inversa. Por un lado, se puede ver que el ratio tiene un efecto positivo, es decir, cuanto mayor sea la cantidad de disolvente, más cantidad de capsaiato se puede extraer por unidad de volumen, hasta llegar a un límite en el que se encontraría muy diluido y no se podría cuantificar. Por otro lado, la temperatura tiene un efecto negativo, es decir, cuanto menor sea la temperatura utilizada mayor es la cantidad de capsaiato extraída, debido a que el capsaiato se degrada fácilmente a temperaturas moderadamente altas.⁶⁴ En relación al tiempo, también presenta un efecto negativo, es decir se extrae una mayor cantidad del compuesto de interés cuanto menor sea el tiempo de extracción, lo cual está también relacionado con su degradabilidad.

Se puede decir que se ha obtenido un método bastante robusto, y que la mezcla de disolventes optimizada, empleando esta técnica de extracción, permite extraer prácticamente la totalidad de la cantidad de capsaiato presente en la muestra de pimienta, de manera que la variación de cualquier otro factor apenas influye.



Si en lugar de haber optimizado el disolvente previamente de forma individual, se introdujera en el diseño de experimentos de Box-Behnken, se obtendría seguramente como una variable de gran significancia con respecto a las demás.

Tras realizar el tratamiento estadístico de los datos, se obtuvieron las condiciones óptimas para la extracción del capsiato presente en las muestras de pimientos Biquinhos mediante la extracción asistida por ultrasonidos, las cuales se muestran en la Tabla 6:

Factor	Valores óptimos
Tiempo (min)	5
Temperatura (°C)	5,5
pH	8
Ratio (mL)	14,5

Tabla 6: Condiciones óptimas para la extracción de capsiato mediante UAE.

Aunque el tiempo de extracción no sea una variable que influye significativamente sobre la respuesta, se obtuvo como valor óptimo el mínimo del intervalo estudiado, por lo que se realizó un estudio univariante de la cinética de extracción para ver si en un menor tiempo se podía extraer la misma o incluso mayor cantidad de capsiato. Para ello, se llevaron a cabo extracciones por triplicado a 1, 2, 5 y 10 minutos en las condiciones óptimas obtenidas previamente (Figura 14).

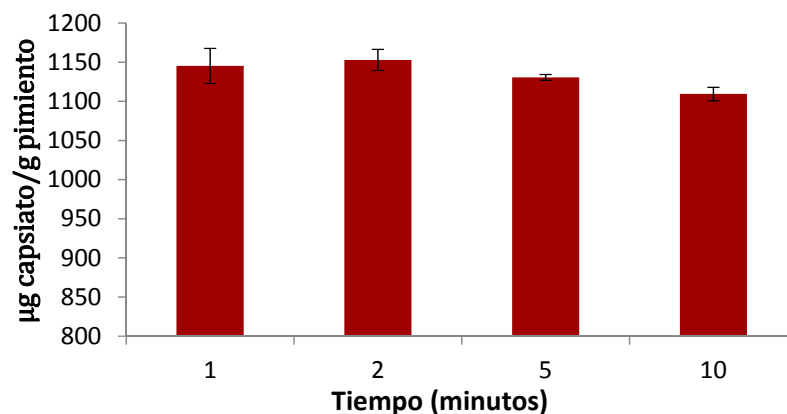


Figura 14: Concentración de capsiato frente al tiempo de extracción en UAE.

Como el pH no es una variable significativa, se realizó la extracción directamente con la mezcla de disolventes metanol y acetato de etilo en las proporciones adecuadas, pero sin ajustar su valor exacto. Se puede observar que no hay diferencias significativas entre 1 y 2 minutos, aunque visualmente se puede ver una mayor cantidad de capsiato extraída a un tiempo de 2 minutos, además de una menor variabilidad en la respuesta.



También se puede ver que el error obtenido es muy pequeño, inferior incluso al 2% en todos los casos, salvo en 1 minuto. Por tanto, se trata de un método bastante rápido, ya que, con tan solo 2 minutos de extracción, se puede extraer la mayor parte del capsiato presente en los pimientos.

5.1.3. Estudio de la repetibilidad y precisión intermedia

Finalmente, se realizó un ensayo de repetibilidad y precisión intermedia, en las condiciones óptimas obtenidas previamente, cuyos resultados se muestran en la Tabla 7. Para la repetibilidad, se realizaron 10 extracciones en un mismo día y para la precisión intermedia, se llevaron a cabo 10 extracciones por día durante tres días consecutivos.

	REPETIBILIDAD	PRECISIÓN INTERMEDIA
Media ($\mu\text{g/g}$)	1320,0358	1316,2197
Desviación estándar ($\mu\text{g/g}$)	21,0651	27,3773
Coefficiente de variación (%)	1,60	2,08

Tabla 7: Ensayos de repetibilidad y precisión intermedia mediante UAE.

Como se puede observar, en ambos casos, el coeficiente de variación es inferior al 5%, que se suele considerar como el límite para afirmar que un método es preciso en este tipo de ensayos. Por tanto, se puede concluir que se trata de un método bastante preciso.

5.2. Extracción asistida por microondas (MAE)

5.2.1. Elección del disolvente óptimo de extracción

Una vez estudiada la extracción asistida por ultrasonidos, se realizó la extracción asistida por microondas. En primer lugar, de nuevo se llevó a cabo un estudio de los disolventes individuales, con la finalidad de ver cuáles extraen una mayor cantidad del compuesto de interés (Figura 15).

Para ello, se realizaron extracciones por duplicado con cada uno de los disolventes (agua Milli-Q, metanol, acetonitrilo, etanol, acetona, acetato de etilo y hexano), utilizando un tiempo de extracción de 5 minutos y fijando una potencia de 800 W, un volumen de 10 mL de cada disolvente y una temperatura de 50 °C, que era la mínima disponible en el equipo.

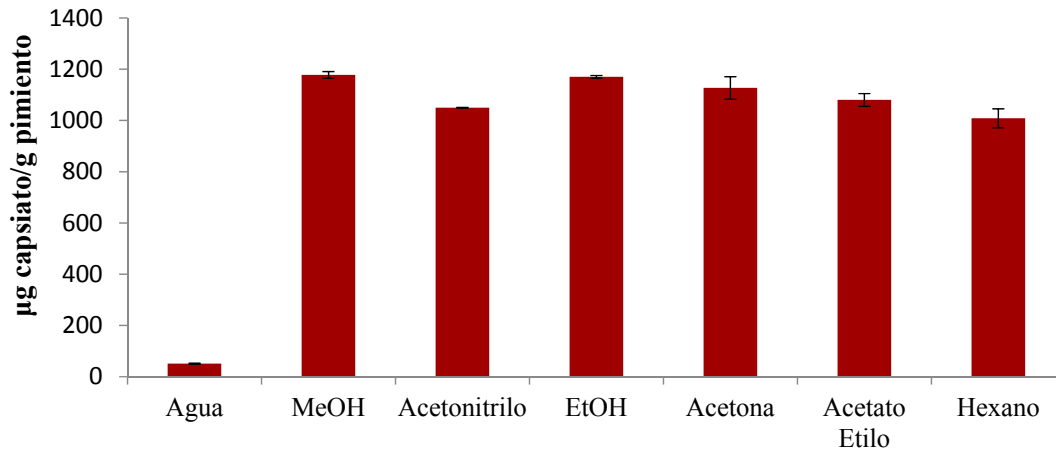


Figura 15: Evaluación del proceso de extracción con disolventes individuales (MAE).

En este caso, los mejores disolventes de extracción fueron el metanol y etanol, seguido de la acetona. Con agua, se puede extraer una cantidad mínima como consecuencia de su alta polaridad en relación a la del capsaiato.

Se puede observar que se obtiene un resultado ligeramente diferente con respecto a la extracción asistida por ultrasonidos. Esto es debido a que, ambos métodos de extracción, tienen diferentes propiedades y funcionamiento. En el caso del ultrasonido, las ondas sonoras se transmiten por todo el material, provocando el fenómeno de la cavitación y calentando toda la muestra uniformemente para que se produzca la extracción. Por el contrario, en el microondas, lo que genera calor es la interacción de la radiación con las moléculas cuando tratan de alinearse con el campo electromagnético. La radiación de microondas provoca principalmente la excitación del enlace O-H, presente en el metanol y etanol, de manera que al absorber energía pasa del estado fundamental a uno excitado, elevando la energía de las moléculas y con ello, su temperatura, para que se produzca la extracción. Como consecuencia, el metanol, etanol y acetona presentan las características tanto de polaridad como de afinidad más adecuadas para la extracción de capsinoides mediante MAE y son los que se utilizaron para llevar a cabo el diseño estadístico de mezcla.

Tal y como se mencionó para la extracción asistida por ultrasonidos, se va a utilizar el modelo Simplex Centroides ampliado con 10 experimentos, mostrando los resultados en la Tabla 16 del Apéndice I. Se usó el programa estadístico Statgraphic Centurion (Versión XVII), que permite obtener distintos modelos matemáticos para explicar los resultados del diseño, validando cada uno de ellos mediante un análisis de la varianza (ANOVA). Estos resultados se muestran en la Tabla 8:



Modelo matemático	<i>p</i> -Valor	Coefficiente R ² (%)	Valor <i>F</i>
Lineal	0,3851	23,8650	1,10
Cuadrático	0,2538	71,8957	2,05
Cúbico	0,3299	78,6285	1,84

Tabla 8: ANOVA de los modelos matemáticos del diseño estadístico de mezcla (MAE).

Se observa que ninguno de los modelos es significativo, es decir, ninguno de ellos presenta un *p*-Valor < 0,05. Por tanto, se utilizará como disolvente óptimo un **100% MeOH**, ya que es el resultado óptimo del modelo que presenta un mayor valor del coeficiente R², mostrándose dicha región en la Figura 16.

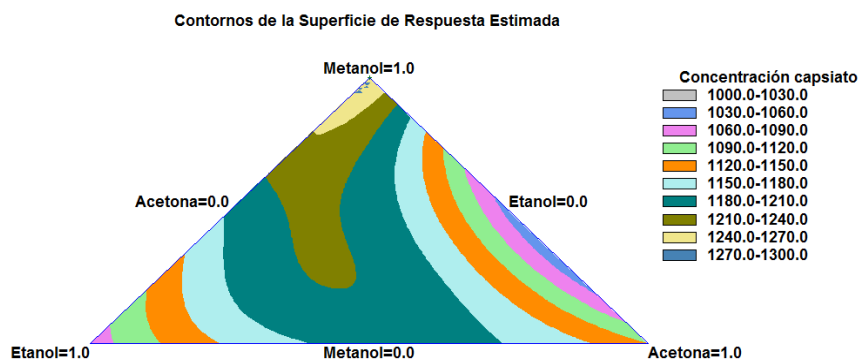


Figura 16: Diagrama para el diseño de Mezcla (MAE).

Debido a que ninguna mezcla influye de manera estadísticamente significativa sobre la respuesta, por sencillez, lo más adecuado es utilizar un 100% de metanol, ya que evita la evaporación del disolvente del extracto y redisolución de los compuestos de interés.

5.2.2. Selección de las condiciones óptimas de la MAE

Una vez definido el mejor disolvente de extracción, se llevó a cabo un diseño de tipo Box-Behnken con cuatro variables independientes (tiempo, temperatura, pH y ratio), cuyos rangos se muestran en la Tabla 9 y una respuesta (concentración de capsaiato).

FACTOR	INTERVALO UTILIZADO
Tiempo (min)	5 – 10 – 15
Temperatura (°C)	50 – 75 – 100
pH	2 – 5 – 8
Ratio (mL)	5 – 10 – 15

Tabla 9: Rango de las variables para las experiencias del diseño en MAE.



Al igual que para ultrasonidos, se realizaron 27 experimentos para la optimización de las variables, en los que se pesó aproximadamente 0,2 gramos de muestra y se utilizó el disolvente optimizado previamente. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 18 del Apéndice II y se utilizó el programa estadístico Statgraphic Centurión (Versión XVII) para el tratamiento de los datos.

Mediante el análisis de la varianza (ANOVA) se obtiene el efecto de cada una de las variables estudiadas de forma individual, así como las posibles interacciones entre las mismas. Para ello, se analizó el coeficiente estimado de la ecuación polinómica de segundo orden y el p -Valor, cuyos resultados se muestran en la Tabla 10.

EFEECTO	COEFICIENTE ESTIMADO	p-VALOR
Tiempo	-23,5363	0,1489
Temperatura	2,4904	0,8731
pH	0,6871	0,9648
Ratio	12,3785	0,4330
Tiempo-Tiempo	-7,6050	0,7454
Tiempo-Temperatura	5,6896	0,8331
Tiempo-pH	-4,3752	0,8713
Tiempo-Ratio	3,0938	0,9087
Temperatura-Temperatura	-14,5056	0,5381
Temperatura-pH	-3,3138	0,9023
Temperatura-Ratio	-10,6582	0,6938
pH-pH	6,8656	0,7693
pH-Ratio	25,5983	0,3518
Ratio-Ratio	-8,4173	0,7194

Tabla 10: Coeficiente estimado de la ecuación polinómica de segundo orden y p -Valor.

Se puede observar que ninguna variable o interacción presenta un p -Valor inferior a 0,05, por lo que no influyen de manera estadísticamente significativa sobre la respuesta, a un nivel de confianza del 95%.

En el diagrama de Pareto mostrado en la Figura 17, se obtiene la misma información observada anteriormente, donde ninguna variable o interacción supera el valor de 2,17, por lo que no son significativas sobre la respuesta a un nivel de confianza del 95%.

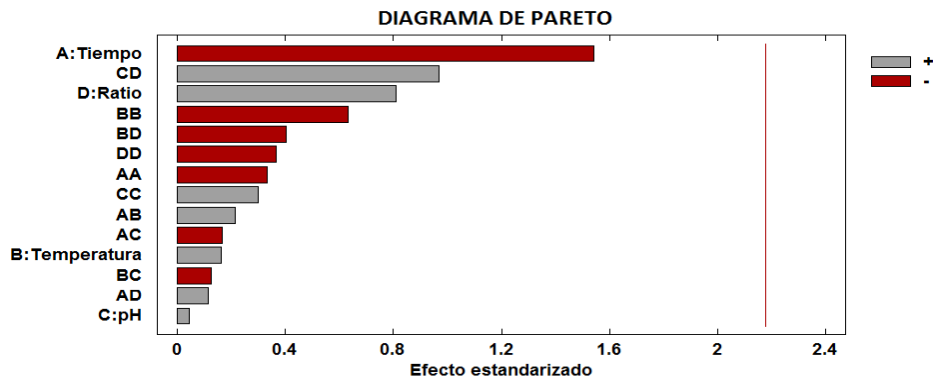


Figura 17: Diagrama de Pareto para la extracción asistida por microondas.

A pesar de no presentar ninguna variable significativa, la más influyente es el tiempo de extracción con un efecto negativo, es decir, cuanto menor sea el tiempo mayor cantidad de capsaiato puede ser extraída; seguida del ratio que presenta, por el contrario, una influencia positiva, es decir, cuanto mayor sea la cantidad de disolvente, más cantidad del compuesto de interés se puede extraer. Finalmente, las otras dos variables analizadas, temperatura y pH, prácticamente no tienen ningún efecto sobre la variable respuesta, es decir, sobre la cantidad de capsaiato extraída.

Al realizar el diseño, se hicieron dos réplicas de cada uno de los experimentos y se obtuvo en todos ellos prácticamente la misma cantidad de capsaiato extraída en ambas réplicas, con errores bastante pequeños, lo que parece indicar que no se ha producido ningún error en el proceso de extracción y cuantificación. Estos resultados indican que se trata de un método muy potente para la extracción de este tipo de compuestos de interés presente en los pimientos. Permite extraer la mayor cantidad de capsaiato de la muestra independientemente de la variación de cualquiera de los factores analizados.

Tras haber realizado el tratamiento estadístico de los datos, se obtienen las condiciones óptimas para la extracción de capsaiato en MAE, mostradas en la Tabla 11:

Factor	Valores óptimos
Tiempo (min)	5
Temperatura (°C)	60
pH	8
Ratio (mL)	15

Tabla 11: Condiciones óptimas para la extracción de capsaiato mediante MAE.

Se puede observar que, en algunas de las variables, se obtiene como valor óptimo uno de los extremos del intervalo.



En el caso del ratio, no se consideró trabajar a valores mayores ya que el compuesto de interés se encontraría muy diluido y no se podría cuantificar correctamente. En relación al pH, prácticamente no influye sobre la respuesta. En cuanto al tiempo, aunque no es significativa, es la que presenta una mayor influencia sobre la respuesta, por lo que se realizó un estudio univariante de la cinética de extracción con la finalidad de ver si en un menor tiempo se podría extraer la misma o incluso mayor cantidad de capsaiato.

Para ello, se realizaron extracciones por triplicado a tiempos comprendidos entre 1 y 20 minutos, en las condiciones óptimas obtenidas previamente (Figura 18). Análogamente, el pH no es una variable significativa, por lo que no fue necesario ajustar su valor exacto en el disolvente óptimo de extracción.

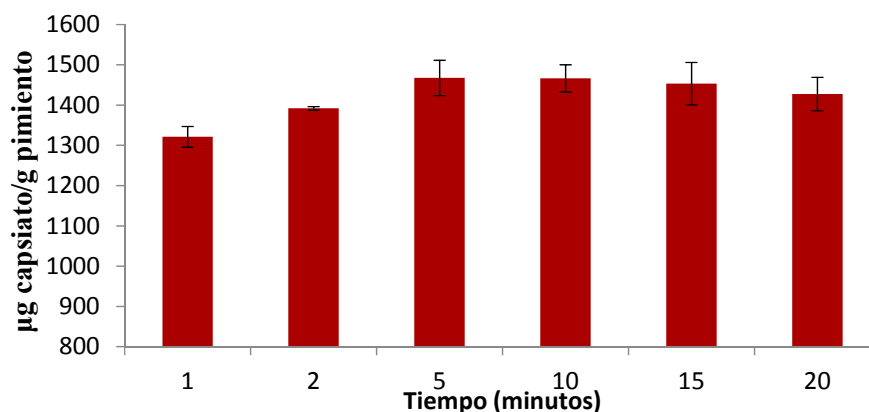


Figura 18: Concentración de capsaiato frente al tiempo de extracción en MAE.

Al realizar el estudio univariante de la cinética de extracción, se puede ver que el tiempo óptimo es de 5 minutos, aunque no exista diferencias significativas entre 5, 10 y 15 minutos. No obstante, se seleccionó este valor por un ahorro de tiempo.

5.2.3. Estudio de la repetibilidad y precisión intermedia

Finalmente, se realizó el ensayo de repetibilidad y precisión intermedia, seleccionando las condiciones óptimas de extracción y de la misma forma a como se hizo para la extracción asistida por ultrasonidos (Tabla 12).

	REPETIBILIDAD	PRECISIÓN INTERMEDIA
Media (µg /g)	1399,7416	1378,3551
Desviación estándar (µg /g)	34,7136	54,5829
Coefficiente de variación (%)	2,48	3,96

Tabla 12: Ensayos de repetibilidad y precisión intermedia mediante MAE.



Se obtienen unos resultados bastante precisos, ya que los valores del coeficiente de variación no exceden del 5%, que se suele considerar como el límite para afirmar que el método es preciso en este tipo de ensayos. En comparación con la extracción asistida por ultrasonidos, se puede decir que se trata de una técnica ligeramente menos precisa, ya que los valores de error son algo mayores.

5.3. Aplicación a muestras reales

Una vez definidas las condiciones óptimas para la extracción de los capsinoides de pimientos Biquinhos, se aplicaron a diferentes variedades de pimiento para verificar la presencia de capsinoides en los mismos y su cuantificación. Se realizaron un total de 60 extracciones (10 muestras reales por triplicado con cada uno de los métodos de extracción desarrollados en condiciones óptimas). Posteriormente, los extractos se analizaron mediante UHPLC-DAD. Los resultados se muestran en la Figura 19.

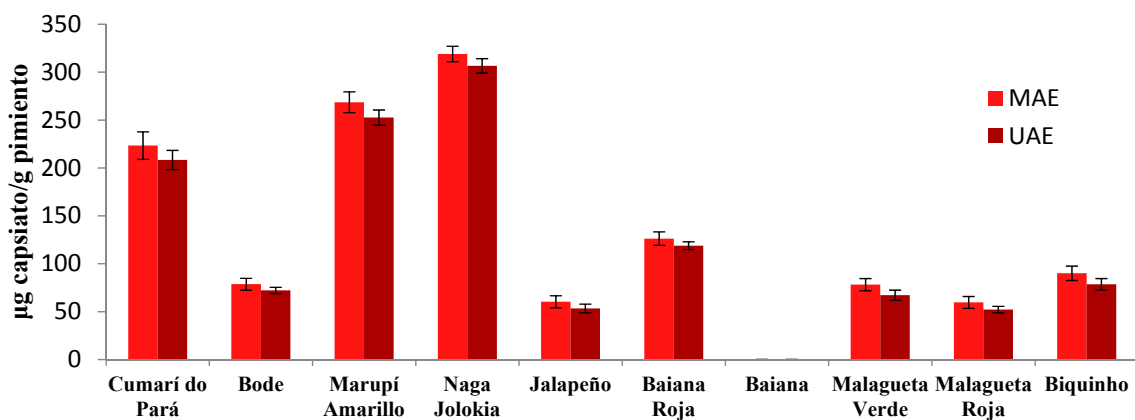


Figura 19: Extracción de capsiato en muestras reales (n = 3).

La metodología de extracción demostró ser eficiente para la extracción de capsinoides en las diferentes variedades de pimientos. Además, se pudo observar que el capsiato estaba presente en variedades de pimiento dulce, como Biquinho, y picante, como Naga Jolokia, Malagueta... En la mayoría de las variedades estudiadas se encontró capsiato, el compuesto de interés; pero en ninguna de ellas estaba presente el dihidrocapsiato. La variedad de pimiento que presentó la mayor cantidad de capsiato fue Naga Jolokia; mientras que, por el contrario, en la variedad Baiana no se encontró la presencia de capsiato con ninguno de los dos métodos de extracción desarrollados.

Por último, se puede decir que no existen diferencias significativas para la extracción de capsiato con ambos métodos de extracción. Sin embargo, visualmente se observa, que se extrae una cantidad ligeramente mayor con MAE.



5.4. Comparación de ambos métodos de extracción

Una vez obtenidos todos los resultados tanto para la extracción asistida por ultrasonidos como por microondas, se realizó una comparación de ambos métodos (Tabla 13).

	DISOLVENTE ÓPTIMO	FACTOR MÁS INFLUYENTE	TIEMPO ÓPTIMO	PROMEDIO (µg / g)
ULTRASONIDOS	42% MeOH + 58% Acetato Etilo	Ratio	2 minutos	1323,6794 ± 32,3054
MICROONDAS	100% MeOH	-	5 minutos	1403,9833 ± 39,94

Tabla 13: Condiciones óptimas de extracción de ambos métodos desarrollados (n = 3).

En primer lugar, se observa la necesidad de un mayor tiempo de extracción empleando MAE. Además, en esta técnica de extracción, no solo hay que tener en cuenta el tiempo de extracción, sino también el tiempo necesario para alcanzar la temperatura deseada y el enfriamiento hasta temperatura ambiente. No obstante, hay que destacar que se pueden introducir de 8 a 40 muestras en el carrusel y realizar la extracción de todas ellas a la vez, mientras que en UAE, se extraen individualmente.

En relación al disolvente óptimo, para UAE, una vez realizado el proceso de extracción y centrifugación de la muestra, es necesario someter el extracto a un proceso de evaporación del disolvente y posterior redisolución del compuesto de interés, ya que el acetato de etilo no se puede introducir en el equipo de cromatografía utilizado. Mientras que, por el contrario, en el caso de MAE no sería necesario y se ahorraría tiempo. No obstante, la técnica UAE es más sencilla, presenta un coste de instalación del equipamiento menor y tiene una mayor disponibilidad en los laboratorios.

Teniendo en cuenta las variables influyentes sobre la respuesta, prácticamente no hay ninguna de gran carácter significativo sobre la cantidad de capsiato extraída. Sin embargo, tras el análisis realizado se observan prácticamente las mismas condiciones óptimas con ambos métodos: temperatura y tiempos mínimos, y volumen de disolvente y pH máximos.

Finalmente, se observa que en promedio se extrae una mayor cantidad de capsiato mediante MAE, en concreto un 5,72% más, aunque presenta un error y una variabilidad algo mayor.



6. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- El método de cromatografía líquida de ultra eficacia (UHPLC) ha resultado ser eficaz para la separación y cuantificación de los capsinoides del pimiento.
- Los dos métodos desarrollados, tanto UAE como MAE, han resultado ser eficaces para la extracción de los capsinoides presentes en el pimiento. Además, en ambos métodos se han obtenido prácticamente las mismas condiciones óptimas: temperatura y tiempos mínimos y ratio y pH máximos, a pesar de no haber una gran significancia de ninguna de ellas sobre la respuesta.
- Ambos métodos de extracción desarrollados presentan una alta repetibilidad y precisión intermedia, con coeficientes de variación inferior al 5%.
- Los métodos de extracción desarrollados no presentan diferencias significativas a la hora de extraer capsinoides en pimientos, a pesar de que visualmente se observa una cantidad mayor de capsinoides extraídos mediante el empleo de MAE.
- Se ha demostrado la aplicabilidad de dichos métodos de extracción de capsinoides en distintas variedades de pimientos, tanto dulces como picantes. No obstante, no se encontraron los compuestos de interés en todas las muestras reales analizadas.

7. PLAN DE DIFUSIÓN

Los resultados obtenidos en este Trabajo Fin de Máster (TFM) deben ser difundidos y transmitidos a la sociedad para que sean útiles. En primer lugar, se debe mencionar que este trabajo se encuentra enmarcado dentro del proyecto “Aplicación de herramientas genómicas y metabolómicas para el estudio del carácter pungente en pimiento y cebolla”, financiado por el INIA (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria).

- Una primera vía de difusión es la presentación en congresos científicos de ámbito nacional o internacional. Con el fin de divulgar el conocimiento adquirido en esta investigación entre la comunidad científica, se va a presentar una comunicación en formato Póster titulada: “**Extracción asistida por ultrasonidos de capsinoides en**



pimientos”, en la XVI REUNIÓN DEL GRUPO REGIONAL ANDALUZ DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA ANALÍTICA (GRASEQA 2018) y que ha sido aceptada por el comité científico para ser presentada el próximo octubre en Granada.

- Posteriormente, se van a presentar comunicaciones en formato póster u oral tituladas: **“Extracción asistida por microondas de capsinoides en pimientos”** y **“Evaluation of microwaves and ultrasounds for the extraction of capsinoids from pepper”**, en el congreso CYTA (Ciencia y Tecnología de los Alimentos) 2019, que tendrá lugar en León; y en el congreso Euroanalysis 2019, que se celebrará en Turquía, respectivamente.
- Por otro lado, estos conocimientos se podrán transmitir a la comunidad científica a través de artículos de investigación en revistas internacionales. Por este motivo, los resultados obtenidos en este trabajo se encuentran en fase de redacción para su publicación en revistas indexadas en el *Journal Citations Reports* (JCR), de alto índice de impacto. Se postulan como posibles revistas para publicar la investigación Food Chemistry o Talanta.
- Asimismo, los resultados más relevantes se comunicarán a los Servicios de Prensa de las Instituciones de las que forman parte los participantes en el proyecto de investigación (IVAGRO y CITA), así como al Servicio Nacional de Información y Noticias Científicas (<http://www.agenciasinc.es>).
- Además, como parte importante de los objetivos de difusión y divulgación de este proyecto, todos los avances del conocimiento quedarán disponibles en la página oficial del IVAGRO (Instituto de Investigaciones Vitivinícola y Agroalimentaria) (www.ivagro.uca.es) y del CITA (Centro de Investigación Agraria de Aragón) (www.cita-aragon.es). Finalmente, se difundirán en redes sociales tanto de ámbito científico como divulgativo (ResearchGate, Twitter...).

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Tripodi P, Cardi T, Bianchi G, et al. Genetic and environmental factors underlying variation in yield performance and bioactive compound content of hot pepper varieties (*Capsicum annuum*) cultivated in two contrasting Italian locations. *Eur Food Res Technol.* 2018;244:1-13.
2. Ananthan R, Subhash K, Longvah T. Capsaicinoids, amino acid and fatty acid profiles in



- different fruit components of the world hottest Naga king chilli (*Capsicum chinense* Jacq). *Food Chem.* 2018;238:51-57.
3. Giuffrida D, Dugo P, Torre G, et al. Characterization of 12 Capsicum varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. *Food Chem.* 2013;140:794-802.
 4. Coutinho JP, Barbero GF, Avellán OF, et al. Use of multivariate statistical techniques to optimize the separation of 17 capsinoids by ultra performance liquid chromatography using different columns. *Talanta.* 2015;134:256-263.
 5. Céspedes CL, Valdez-Morales M, Avila JG, El-Hafidi M, Alarcón J, Paredes-López O. Phytochemical profile and the antioxidant activity of Chilean wild black-berry fruits, *Aristotelia chilensis* (Mol) Stuntz (*Elaeocarpaceae*). *Food Chem.* 2010;119:886-895.
 6. Reddy KK, Ravinder T, Prasad RBN, Kanjilal S. Evaluation of the antioxidant activity of capsiate analogues in polar, nonpolar, and micellar media. *J Agric Food Chem.* 2011;59:564-569.
 7. Evangelista S. Novel therapeutics in the field of capsaicin and pain. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2015;8:373-375.
 8. Barbero GF, Liazid A, Palma M, Barroso CG. Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from peppers. *Talanta.* 2008;75:1332-1337.
 9. Chan KK, Hamid MS Bin, Webster RD. Quantification of capsaicinoids in chillies by solid-phase extraction coupled with voltammetry. *Food Chem.* 2018;265:152-158.
 10. Luo XJ, Peng J, Li YJ. Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. *Eur J Pharmacol.* 2011;650:1-7.
 11. Jackson S, Swiner DJ, Capone PC, Badu-Tawiah AK. Thread spray mass spectrometry for direct analysis of capsaicinoids in pepper products. *Anal Chim Acta.* 2018;1023:81-88.
 12. Trbojević Ivić J, Milosavić N, Dimitrijević A, et al. Synthesis of medium-chain length capsinoids from coconut oil catalyzed by *Candida rugosa* lipases. *Food Chem.* 2017;218:505-508.
 13. Sutoh K, Kobata K, Yazawa S, Watanabe T. Capsinoid Is Biosynthesized from Phenylalanine and Valine in a Non-Pungent Pepper, *Capsicum annuum* L. cv. CH-19 Sweet. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2006;70:1513-1516.
 14. Lang Y, Kisaka H, Sugiyama R, et al. Functional loss of pAMT results in biosynthesis of capsinoids, capsaicinoid analogs, in *Capsicum annuum* cv. CH-19 sweet. *Plant J.* 2009;59:953-961.
 15. Fayos O, Savirón M, Orduna J, Barbero GF, Mallor C, Garcés-Claver A. Quantitation of capsiate and dihydrocapsiate and tentative identification of minor capsinoids in pepper fruits (*Capsicum* spp.) by HPLC-ESI-MS/MS(QTOF). *Food Chem.* 2019;270:264-272.



16. Haramizu S, Kawabata F, Masuda Y, et al. Capsinoids, Non-Pungent Capsaicin Analogs, Reduce Body Fat Accumulation without Weight Rebound unlike Dietary Restriction in Mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2011;75:95-99.
17. Swint JM, Beining KM, Bryant JA, Tucker RM, Ludy MJ. Comparison of Capsaicin and Capsiate's Effects at a Meal. *Chemosens Percept.* 2015;8:174-182.
18. I PPB, Mara G, Gonçalves S, Henrique G, Villaça MC. Capsiate treatment in liver surgeries may compromise its recovery 1. *Acta Cirurgia Bras.* 2018;33:439-445.
19. Materia EN, Pct DEP. WO 2008/129094 A1. 2008;(12).
20. Barbero GF, Molinillo JMG, Varela RM, Palma M, Macías FA, Barroso CG. Application of hansch's model to capsaicinoids and capsinoids: A study using the quantitative structure-activity relationship. A novel method for the synthesis of capsinoids. *J Agric Food Chem.* 2010;58:3342-3349.
21. Bucić-Kojić A, Planinić M, Tomas S, Bilić M, Velić D. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *J Food Eng.* 2007;81:236-242.
22. Mandal V, Tandey R. A critical analysis of publication trends from 2005-2015 in microwave assisted extraction of botanicals: How far we have come and the road ahead. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2016;82:100-108.
23. Castejón N, Luna P, Señoráns FJ. Alternative oil extraction methods from *Echium plantagineum* L. seeds using advanced techniques and green solvents. *Food Chem.* 2018;244:75-82.
24. Amiri S, Shakeri A, Sohrabi M reza, Khalajzadeh S, Ghasemi E. Optimization of ultrasonic assisted extraction of fatty acids from *Aesculus hippocastanum* fruit by response surface methodology. *Food Chem.* 2018;271:762-766.
25. Moreira MM, Barroso MF, Boeykens A, Withouck H, Morais S, Delerue-Matos C. Valorization of apple tree wood residues by polyphenols extraction: Comparison between conventional and microwave-assisted extraction. *Ind Crops Prod.* 2017;104:210-220.
26. Wen C, Zhang J, Zhang H, et al. Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops – A review. *Ultrason Sonochem.* 2018;48:538-549.
27. Esclapez MD, García-Pérez J V., Mulet A, Cárcel JA. Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products. *Food Eng Rev.* 2011;3:108-120.
28. Espada-Bellido E, Ferreiro-González M, Carrera C, Palma M, Barroso CG, Barbero GF. Optimization of the ultrasound-assisted extraction of anthocyanins and total phenolic compounds in mulberry (*Morus nigra*) pulp. *Food Chem.* 2017;219:23-32.
29. Wang L, Weller CL. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Technol.* 2006;17:300-312.
30. Luque de Castro MD, Delgado-Povedano MM. Ultrasound: A subexploited tool for



- sample preparation in metabolomics. *Anal Chim Acta*. 2014;806:74-84.
31. Riciputi Y, Diaz-de-Cerio E, Akyol H, et al. Establishment of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from industrial potato by-products using response surface methodology. *Food Chem*. 2018;269:258-263.
 32. Duan LL, Jiang R, Shi Y, Duan CQ, Wu GF. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of higher fatty acids in grape berries (seed-free fruit sections). *Anal Methods*. 2016;8:6208-6215.
 33. Wang T, Guo N, Wang SX, Kou P, Zhao CJ, Fu YJ. Ultrasound-negative pressure cavitation extraction of phenolic compounds from blueberry leaves and evaluation of its DPPH radical scavenging activity. *Food Bioprod Process*. 2018;108:69-80.
 34. Chaturvedi AK. Extraction of Nutraceuticals from Plants by Microwave Assisted Extraction. *Sys Rev Pharm*. 2018;9:31-35.
 35. Chan CH, Yusoff R, Ngoh GC, Kung FWL. Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *J Chromatogr A*. 2011;1218:6213-6225.
 36. Routray W, Orsat V. Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review. *Food Bioprocess Technol*. 2012;5:409-424.
 37. Spigno G, De Faveri DM. Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study. *J Food Eng*. 2009;93:210-217.
 38. Kazemi M, Khodaiyan F, Labbafi M, Saeid Hosseini S, Hojjati M. Pistachio green hull pectin: Optimization of microwave-assisted extraction and evaluation of its physicochemical, structural and functional properties. *Food Chem*. 2019;271:663-672.
 39. Pinela J, Prieto MA, Carvalho AM, et al. Microwave-assisted extraction of phenolic acids and flavonoids and production of antioxidant ingredients from tomato: A nutraceutical-oriented optimization study. *Sep Purif Technol*. 2016;164:114-124.
 40. Akhbari M, Masoum S, Aghababaei F, Hamed S. Optimization of microwave assisted extraction of essential oils from Iranian *Rosmarinus officinalis* L. using RSM. *J Food Sci Technol*. 2018;55:2197-2207.
 41. Koyu H, Kazan A, Demir S, Haznedaroglu MZ, Yesil-Celiktas O. Optimization of microwave assisted extraction of *Morus nigra* L. fruits maximizing tyrosinase inhibitory activity with isolation of bioactive constituents. *Food Chem*. 2018;248:183-191.
 42. Yang C, Ren C, Piao X, Kannan N, Li D. An on-line sample pretreatment technique for the HPLC analysis of plant samples. *J Sep Sci*. 2013;36:3599-3607.
 43. Conceição AA, Neto CBS, de Aquino Ribeiro JA, de Siqueira FG, Miller RNG, Mendonça S. Development of an RP-UHPLC-PDA method for quantification of free gossypol in cottonseed cake and fungal-treated cottonseed cake. *PLoS One*. 2018;13:1-17.
 44. Guiochon G. Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. *J*



- Chromatogr A.* 2007;1168:101-168.
45. Bélanger JMR, Jocelyn Paré JR, Sigouin M. Chapter 2 High performance liquid chromatography (HPLC): Principles and applications. *Tech Instrum Anal Chem.* 1997;18:37-59.
 46. Graf TN, Cech NB, Polyak SJ, Oberlies NH. A validated UHPLC-tandem mass spectrometry method for quantitative analysis of flavonolignans in milk thistle (*Silybum marianum*) extracts. *J Pharm Biomed Anal.* 2016;126:26-33.
 47. Han J, Wanrooij J, van Bommel M, Quye A. Characterisation of chemical components for identifying historical Chinese textile dyes by ultra high performance liquid chromatography – photodiode array – electrospray ionisation mass spectrometer. *J Chromatogr A.* 2017;1479:87-96.
 48. da Silva LP, Madureira F, de Azevedo Vargas E, Faria AF, Augusti R. Development and validation of a multianalyte method for quantification of mycotoxins and pesticides in rice using a simple dilute and shoot procedure and UHPLC-MS/MS. *Food Chem.* 2019;270:420-427.
 49. Mayer HK, Fiechter G. UHPLC analysis of biogenic amines in different cheese varieties. *Food Control.* 2018;93:9-16.
 50. Pereira CG, Barreira L, Bijttebier S, et al. Chemical profiling of infusions and decoctions of *Helichrysum italicum* subsp. *picardii* by UHPLC-PDA-MS and in vitro biological activities comparatively with green tea (*Camellia sinensis*) and rooibos tisane (*Aspalathus linearis*). *J Pharm Biomed Anal.* 2017;145:593-603.
 51. Lu H, Zhang H, Chingin K, Xiong J, Fang X, Chen H. Ambient Mass Spectrometry for Food Science and Industry. *TrAC Trends Anal Chem.* 2018;107:99-115.
 52. Kriegsmann J, Casadonte R, Kriegsmann K, Longuespée R, Kriegsmann M. Mass spectrometry in pathology – Vision for a future workflow. *Pathol Res Pract.* 2018;214:1057-1063.
 53. Menet MC. Principes de la spectrométrie de masse. *Rev Francoph des Lab.* 2011;2011:41-53.
 54. Yılmaz C, Taş NG, Kocadağlı T, Gökmen V. Determination of serotonin in nuts and nut containing products by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 2019;272:347-353.
 55. Valverde S, Ibáñez M, Bernal JL, Nozal MJ, Hernández F, Bernal J. Development and validation of ultra high performance-liquid chromatography–tandem mass spectrometry based methods for the determination of neonicotinoid insecticides in honey. *Food Chem.* 2018;266:215-222.
 56. Zhang LL, Bai YL, Shu SL, et al. Simultaneous quantitation of nucleosides, nucleobases, amino acids, and alkaloids in mulberry leaf by ultra high performance liquid



- chromatography with triple quadrupole tandem mass spectrometry. *J Sep Sci.* 2014;37:1265-1275.
57. De Aguiar AC, Coutinho JP, Barbero GF, Godoy HT, Martínez J. Comparative study of capsaicinoid composition in Capsicum Peppers grown in Brazil. *Int J Food Prop.* 2016;19:1292-1302.
 58. Garcia LMZ, de Oliveira TF, Soares PK, Bruns RE, Scarminio IS. Statistical mixture design - Principal component determination of synergic solvent interactions for natural product extractions. *Chemom Intell Lab Syst.* 2010;103:1-7.
 59. Ellis K, Silvestrini R, Varela B, Alharbi N, Hailstone R. Modeling setting time and compressive strength in sodium carbonate activated blast furnace slag mortars using statistical mixture design. *Cem Concr Compos.* 2016;74:1-6.
 60. DiCiaula MC, Lopes GC, Scarminio IS, De Mello JCP. Optimization of solvent mixtures for extraction from bark of *schinus terebinthifolius* by a statistical mixture-design technique and development of a UV-Vis spectrophotometric method for analysis of total polyphenols in the extract. *Quim Nova.* 2014;37:158-163.
 61. Ghafari E, Costa H, Júlio E. Statistical mixture design approach for eco-efficient UHPLC. *Cem Concr Compos.* 2015;55:17-25.
 62. Wen Y, Chen H, Zhou X, et al. Optimization of the microwave-assisted extraction and antioxidant activities of anthocyanins from blackberry using a response surface methodology. *RSC Adv.* 2015;5:19686-19695.
 63. Ferreira SLC, Bruns RE, Ferreira HS, et al. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Anal Chim Acta.* 2007;597:179-186.
 64. Ohyama K, Nogusa Y, Shinoda K, Suzuki K, Bannai M, Kajimura S. A synergistic antiobesity effect by a combination of capsinoids and cold temperature through promoting beige adipocyte biogenesis. *Diabetes.* 2016;65:1410-1423.



9. APÉNDICES

APÉNDICE I

N° experimento	Acetona	Metanol	Acetato de Etilo	Capsiato (µg/g)
1	1	0	0	982,3798
2	0	1	0	859,2195
3	0	0	1	977,2840
4	0,5	0,5	0	1033,3243
5	0	0,5	0,5	1082,5323
6	0,5	0	0,5	992,0915
7	0,66	0,17	0,17	1024,6064
8	0,17	0,66	0,17	1045,8039
9	0,17	0,17	0,66	1019,2248
10	0,33	0,33	0,33	1060,0510

Tabla 14: Diseño estadístico de mezcla modelo Simplex Centroide para UAE.

N° experimento	Metanol	Etanol	Acetona	Capsiato (µg/g)
1	1	0	0	1255,7001
2	0	1	0	1083,9585
3	0	0	1	1124,2505
4	0,5	0,5	0	1169,6373
5	0	0,5	0,5	1202,7151
6	0,5	0	0,5	1026,3764
7	0,66	0,17	0,17	1289,5222
8	0,17	0,66	0,17	1157,8290
9	0,17	0,17	0,66	1154,5725
10	0,33	0,33	0,33	1169,5619

Tabla 15: Diseño estadístico de mezcla modelo Simplex Centroide para MAE.



APÉNDICE II

BLOQUE	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	pH	Ratio (mL)	Capsiato (µg/g)
1	0	0	0	0	1142,0545
1	0	1	0	1	1120,8040
1	0	1	-1	0	1157,5197
1	-1	1	0	0	1167,8894
1	1	0	-1	0	1153,0245
1	0	-1	0	1	1181,9430
1	0	-1	1	0	1188,0619
1	-1	-1	0	0	1209,4128
1	1	-1	0	0	1154,2412
1	1	0	0	-1	1121,7478
1	0	0	-1	-1	1144,1691
1	0	0	0	0	1145,7680
1	0	0	1	-1	1105,8330
1	1	0	1	0	1150,3841
1	1	1	0	0	1168,4172
1	0	-1	-1	0	1145,7682
1	0	1	0	-1	1126,5295
1	0	-1	0	-1	1135,6231
1	0	1	1	0	1131,5028
1	0	0	1	1	1177,4747
1	-1	0	1	0	1142,3949
1	-1	0	0	-1	1129,5525
1	-1	0	-1	0	1140,6957
1	0	0	-1	1	1186,9691
1	0	0	0	0	1142,0927
1	-1	0	0	1	1128,3277
1	1	0	0	1	1159,5555

Tabla 16: Diseño de experimentos Box-Behnken para 4 variables (UAE).



BLOQUE	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	pH	Ratio (mL)	Capsiato (µg/g)
1	0	0	0	0	1335,5773
1	0	1	0	1	1356,1753
1	0	1	-1	0	1369,7249
1	-1	1	0	0	1388,8615
1	1	0	-1	0	1341,5354
1	0	-1	0	1	1346,2919
1	0	-1	1	0	1380,2474
1	-1	-1	0	0	1419,4090
1	1	-1	0	0	1394,2541
1	1	0	0	-1	1294,0196
1	0	0	-1	-1	1449,6367
1	0	0	0	0	1423,8285
1	0	0	1	-1	1361,7313
1	1	0	1	0	1360,1833
1	1	1	0	0	1386,4650
1	0	-1	-1	0	1360,1864
1	0	1	0	-1	1432,5308
1	0	-1	0	-1	1380,0148
1	0	1	1	0	1376,5305
1	0	0	1	1	1437,1724
1	-1	0	1	0	1469,0884
1	-1	0	0	-1	1327,4946
1	-1	0	-1	0	1432,9397
1	0	0	-1	1	1422,6847
1	0	0	0	0	1440,9404
1	-1	0	0	1	1426,3725
1	1	0	0	1	1405,2727

Tabla 17: Diseño de experimentos Box-Behnken para 4 variables (MAE).



APÉNDICE III

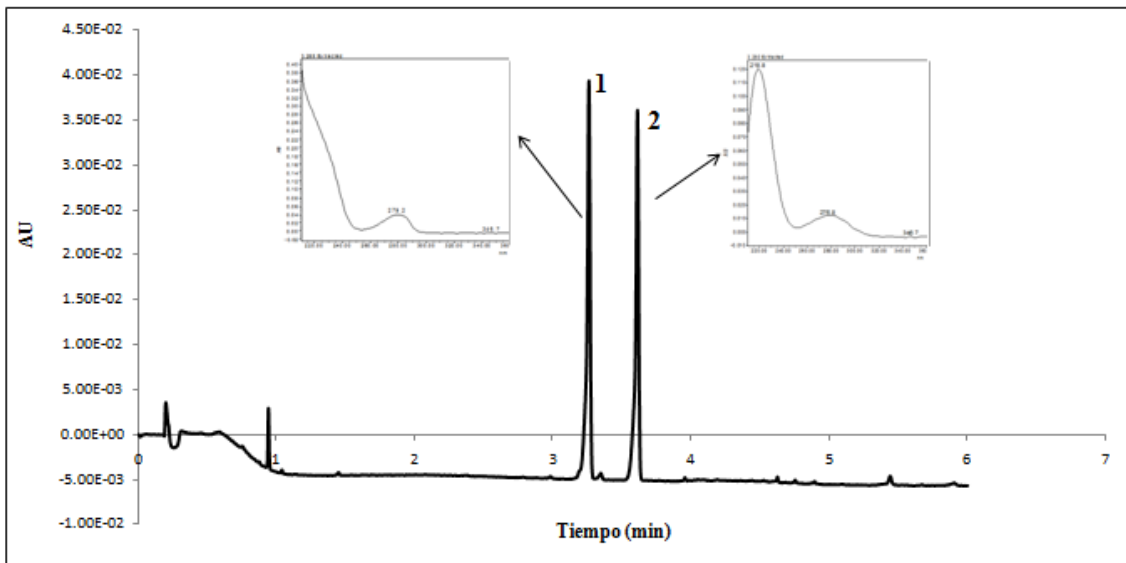


Figura 20: Cromatograma de separación de capsinoides. 1. Capsiato;
2. Dihidrocapsiato ($\lambda = 280 \text{ nm}$).

APÉNDICE IV

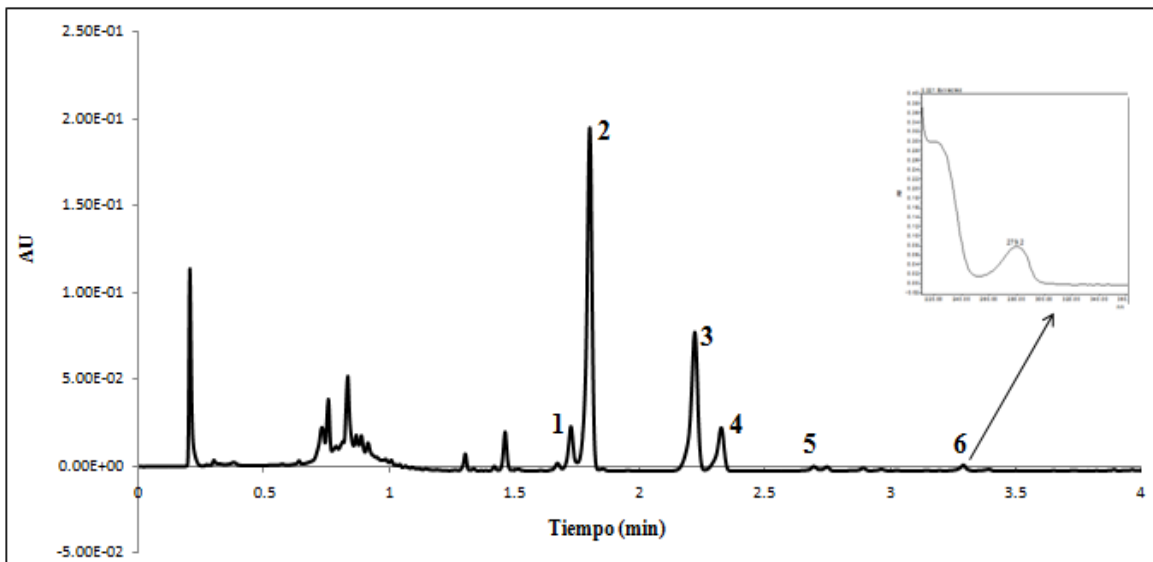


Figura 21: Cromatograma de la variedad picante Naga Jolokia.
1. Nordihidrocapsaicina; 2. Capsaicina; 3. Dihidrocapsaicina; 4. Homocapsaicina;
5. Homodihidrocapsaicina; 6. Capsiato ($\lambda = 280 \text{ nm}$).



APÉNDICE V

Lista de siglas y acrónimos

- **ANOVA:** Análisis de la varianza (Analysis of variance)
- **Espectroscopia UV-Vis:** Espectroscopia ultravioleta-visible
- **PDA:** Detector de matriz de fotodiodos (Photodiode array detector)
- **HPLC:** Cromatografía líquida de alta eficacia (High performance liquid chromatography)
- **UHPLC:** Cromatografía líquida de ultra eficacia (Ultra-high performance liquid chromatography)
- **MAE:** Extracción asistida por microondas (Microwave assisted extraction)
- **UAE:** Extracción asistida por ultrasonidos (Ultrasound assisted extraction)
- **ToF-MS:** Espectroscopia de masas de cuadrupolo-tiempo de vuelo (Quadruple time of flight mass spectrometry)
- **BBD:** Diseño experimental de Box-Behnken (Box-Behnken design)